

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Ludwig-Maximilians Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg

---

# Einfluss von Flavonoiden und physischem Stress auf das Immunsystem

Betrachtung dendritischer Zellen und Toll-like Rezeptoren

---

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Georg Korbinian Waidhauser

aus  
Fürth

Jahr  
2013

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Ute Wilbert-Lampen
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Berthold Koletzko
	PD Dr. Irmgard Bumeder
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Thomas Nickel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	11.07.2013

Meinen lieben Eltern Anita und Michael Waidhauser in tiefer Dankbarkeit.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	- 1 -
1.1	Atherosklerose.....	- 1 -
1.1.1	Atherosklerose allgemein.....	- 1 -
1.1.2	Oxidativer Stress .....	- 2 -
1.1.3	Einfluss von Flavonoiden auf das kardiovaskuläre System.....	- 2 -
1.2	Stress .....	- 4 -
1.2.1	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HPA-Achse) .....	- 4 -
1.2.2	Marathon als Stressmodell .....	- 4 -
1.3	Dendritische Zellen .....	- 7 -
1.3.1	Überblick über die dendritischen Zellen (DC).....	- 7 -
1.3.2	Immunmodulatorisches Potential von Flavonoiden auf dendritische Zellen. ....	- 10 -
1.4	Toll-like Rezeptoren.....	- 11 -
1.4.1	Funktionsweise der Toll-like Rezeptoren (TLR) .....	- 11 -
1.4.2	Auswirkung von körperlicher Betätigung auf Toll-like Rezeptoren und dendritische Zellen .....	- 12 -
2	Material, Methoden und Studiendesign .....	- 13 -
2.1	Studiengrundlage.....	- 13 -
2.1.1	Studienintention .....	- 13 -
2.1.2	Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie .....	- 13 -
2.1.3	Einschlusskriterien .....	- 15 -
2.1.4	Ausschlusskriterien .....	- 15 -
2.1.5	Studienziel und Endpunkte .....	- 16 -
2.1.6	Studiengetränk .....	- 17 -
2.2	Materialien .....	- 19 -
2.2.1	Geräte .....	- 19 -
2.2.2	Chemikalien Reagenzien.....	- 19 -
2.2.3	Antikörper .....	- 20 -
2.2.4	Behältnisse und Reaktionszellen.....	- 20 -
2.2.5	Statistik und Steuersoftware.....	- 21 -

2.3	Experimentelle Methodik.....	- 22 -
2.3.1	Durchflusszytometrie .....	- 22 -
2.3.2	RNA-Isolierung und cDNA Umschreibung.....	- 23 -
2.3.3	Real-time PCR .....	- 25 -
2.4	Statistik.....	- 27 -
3	Ergebnisse .....	- 28 -
3.1	Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Subpopulationen im peripheren Blut.....	- 28 -
3.1.1	Entwicklung der relativen Anzahl der mDC (BDCA1 positiv) im Blut während des Versuchszeitraumes .....	- 28 -
3.1.2	Vergleich der Verum- mit der Placebogruppe bezüglich der relativen Anzahl der mDC im peripheren Blut.....	- 29 -
3.1.3	Entwicklung der relativen Anzahl der pDC (BDCA2 positiv) im Blut während des Versuchszeitraumes .....	- 30 -
3.1.4	Vergleich der Verum- mit der Placebogruppe bezüglich der relativen Anzahl der pDC im peripheren Blut.....	- 31 -
3.1.5	Untergliederung der Verumgruppe in 3 Subgruppen basierend auf der Trinkmenge .....	- 32 -
3.2	TLR Genexpression .....	- 34 -
3.2.1	Veränderung der TLR 2 Genexpression im Studienverlauf.....	- 34 -
3.2.2	Veränderung der TLR 4 Genexpression im Studienverlauf.....	- 36 -
3.2.3	Veränderung der TLR 7 Genexpression im Studienverlauf.....	- 38 -
3.2.4	Vergleich der Verumgruppe und ihrer Subgruppen mit der Placebogruppe hinsichtlich der Toll-like Rezeptor Genexpression.....	- 40 -
4	Diskussion.....	- 44 -
4.1	Hintergrund .....	- 44 -
4.2	Immunmodulatorischer Effekt von aeroben Ausdauertraining und Extrembelastung auf dendritische Zellen und Toll-like Rezeptoren.....	- 45 -
4.2.1	Trainingsphase .....	- 45 -
4.2.2	Marathon .....	- 46 -
4.3	Immunmodulatorischer Effekt von Flavonoiden .....	- 49 -
4.4	Limitationen der Studie.....	- 51 -
5	Zusammenfassung.....	- 52 -

6	Abkürzungsverzeichnis .....	- 54 -
7	Abbildungsverzeichnis .....	- 55 -
8	Tabellenverzeichnis.....	- 57 -
9	Literaturverzeichnis.....	- 58 -
10	Danksagung.....	- 63 -
11	Eidesstattliche Erklärung .....	- 64 -

# **1 Einleitung**

## **1.1 Atherosklerose**

### **1.1.1 Atherosklerose allgemein**

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokardinfarkte und Apoplexe bedingen in westlichen Industrienationen weiterhin die häufigsten Todesursachen vor Tumorerkrankungen und Erkrankungen des Atemwegsystems (Statistisches Bundesamt Deutschland 2010). Aufgrund dieser Bedeutung und der weiterhin hohen Zahlen hinsichtlich Prävalenz, Morbidität und Mortalität ist die Untersuchung möglicher, aktuell noch wenig erforschter Risikofaktoren von Bedeutung. Eine Fokussierung der primären Prävention durch Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren sollte hierbei im Mittelpunkt der Bemühungen stehen. Bei der Prävention spielen neben der medikamentösen Prophylaxe z. B. mittels Thrombozytenaggregationshemmer oder Statinen auch die sogenannten life-style Faktoren wie eine gesunde Ernährung, sportliche Aktivität und Stressreduktion eine wesentliche Rolle [1].

Als klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren gelten der arterielle Hypertonus, erhöhtes low-density Cholesterin (LDL-Cholesterin), der Diabetes mellitus, ein Nikotinabusus sowie eine positive Familienanamnese. Einen wichtigen Einfluss haben zudem eine atherogene Ernährung, eine mangelnde körperliche Aktivität und damit häufig verbundene Adipositas, sowie rezidivierende virale und bakterielle Infektionen [2-3].

Forschungsergebnisse in den letzten 15 Jahren zeigen, dass Entzündungsvorgängen bei der Genese der Atherosklerose eine große Bedeutung beigemessen werden muss. Die früher gängige Meinung, Atherosklerose sei eine reine Lipidspeicherkrankheit, wurde von einem multifaktoriellen Ansatz, bei dem Entzündungsreaktionen eine tragende Rolle spielen, abgelöst. Die auf inter- und intrazellulärer Ebene ablaufenden Vorgänge unterscheiden sich bei Atherosklerose nicht grundlegend von denen anderer chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie zum Beispiel Leberzirrhose, rheumatoide Arthritis und Lungenfibrose [4]. Die frühesten Darstellungsformen atheroskleröser Veränderungen, die fatty streaks sind bereits bei Säuglingen und jungen Kindern zu finden [5] und sind meist durch LDL sowie oxidiertes LDL (oxLDL) hervorgerufene, entzündliche Ansammlungen von Monozyten und dendritischen Zellen (DC) [6].

### **1.1.2 Oxidativer Stress**

Einen wichtigen Baustein der Atherosklerose stellt oxidativer Stress dar, der für viele kardiovaskuläre Risikofaktoren die gemeinsame Endstrecke bildet [7]. Oxidativer Stress ist ein übermäßiger Anfall reaktiver Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikal  $\text{OH}^\cdot$  und das Hyperoxid Anion  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . In der Gefäßwand führt eine gesteigerte Konzentration von Sauerstoffradikalen zu einer reduzierten Bioverfügbarkeit des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) und zu einer erhöhten Produktion an Endothelin-1, der potenteste endogene Vasokonstriktor [8]. Die durch oxidativen Stress bedingte endotheliale Dysfunktion führt zu Veränderungen, die eine Entzündungsreaktion im Endothel zur Folge haben [9-10]. Oxidativer Stress induziert eine vermehrte Oxidation von LDL und führt damit zur Bildung von oxLDL [7]. oxLDL wirkt als Autoantigen und wird in der Gefäßwand vermehrt mittels scavenger Rezeptoren von DC und Makrophagen aufgenommen. Hierdurch kommt es zu einer verringerten Beweglichkeit der Zellen, zu Zytotoxizität und der Bildung von Schaumzellen, die dann selbst die Entzündungsreaktion weiter verstärken und somit zu einem Circulus vitiosus führen [6]. Die DC und Makrophagen setzen in der Läsion hydrolytische Enzyme, Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die zu einer Einwanderung von T-Lymphozyten und einer Vergrößerung des Plaque führen [4]. Durch die Ausschüttung von Metalloproteasen durch Makrophagen, die von aktivierten T-Zellen stimuliert werden, kommt es zu einer Plaqueinstabilität mit Gefahr der Ruptur, die, je nach Lokalisation, z.B. zu einem Myokardinfarkt oder einem Apoplex führen kann [11].

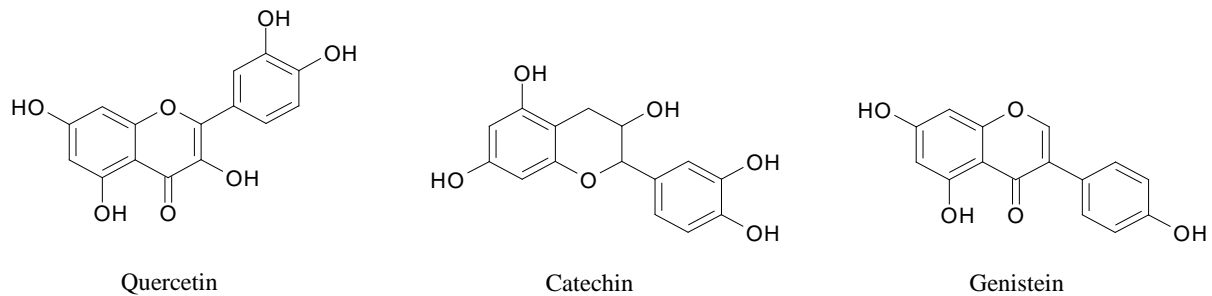
Oxidativer Stress und damit das Auftreten und Voranschreiten von Atherosklerose kann mittels oraler Aufnahme von Antioxidantien-enthaltenen Nahrungsmitteln, z.B. Flavonoiden, reduziert werden [12-13].

### **1.1.3 Einfluss von Flavonoiden auf das kardiovaskuläre System**

Flavonoide sind polyphenolische Bestandteile von Pflanzen. Sie sind eine große heterogene Gruppe, deren Vertreter chemisch alle drei Ringstrukturen beinhalten, zwei aromatische Ringe und eine zentrale oxygenierte Ringstruktur. Anhand der Verbindung zwischen B-Ring und C-Ring sowie der Oxygenierung an funktionellen Gruppen am C-Ring, lassen sich die Flavonoide in verschiedene Untergruppen aufteilen. Drei der wichtigsten Untergruppen stellen Flavonole (z.B. Quercetin), Flavanole (z.B. Catechin) und Isoflavone (z.B. Genistein) dar. Bedeutende Quellen für Flavonoide in der menschlichen Ernährung sind unter anderen Äpfel, Beeren, Zwiebeln, Paprika, verschiedene Teesorten wie grüner und weißer Tee sowie



rote Weintrauben und Rotwein. Die tägliche Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung beträgt zwischen 20 und 35 mg, wobei Quercetin hierzu den größten Teil beiträgt [14-15].



**Abbildung 1: Chemische Strukturformeln von Quercetin, Catechin und Genistein**

In verschiedenen Studien konnten anti-oxidative und anti-inflammatorische Wirkungen der Flavonoide als Hinweis auf eine kardioprotektive Eigenschaft der Substanzgruppe aufgezeigt werden [16-18]. Diese kardioprotektive Potenz spiegelt sich auch im sogenannten französischen Paradoxon wieder, welches eine relativ geringe Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen trotz relativ hoher Aufnahme gesättigter Fettsäuren mit der Nahrung zeigt. Dieser Widerspruch wird durch den, im Vergleich zu anderen Ländern, höheren Konsum von Rotwein und Trauben, die einen hohen Gehalt von Flavonoiden aufweisen, erklärt [19-20]. Wie Rotwein, enthält auch Bier eine Vielzahl an Flavonoiden [21]. Bereits im Mittelalter wurde, unter anderem durch Hildegard von Bingen, Bier als Heilmittel gegen Herzbeschwerden beschrieben [22].

## **1.2 Stress**

### **1.2.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HPA-Achse)**

Stress ist in den heutigen Gesellschaften allgegenwärtig. Im ursprünglichen Sinne bedeutet Stress eine physiologische Antwort des menschlichen Körpers auf psychische und physische Belastungen.

Wichtiger Bestandteil der akuten Stressantwort beim Menschen ist die Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit einer vermehrten Ausschüttung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin. Bei länger andauerndem Stress kommt es zudem zu einer Aktivierung der HPA-Achse [23]. Im Hypothalamus gebildetes und freigesetztes Cortisol-Releasing Hormon (CRH) bewirkt in der Adenohypophyse die Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH). Zusätzlich induziert CRH am Endothel eine erhöhte Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin-1, vermittelt über CRH-R2 Rezeptoren. In vitro konnte zudem eine Abnahme von NO, dem potentesten endogenen Vasodilatator, aufgezeigt werden [24].

In der Nebennierenrinde führt ACTH zu einer vermehrten Bildung und Freisetzung von Glucokortikoiden wie Kortisol. Glucokortikoide steigern im menschlichen Körper unter anderem die Lipolyse, den Proteinabbau in der Peripherie, die Glukoneogenese, die Bildung neutrophiler Granulozyten und den Knochenabbau. Auf der anderen Seite hemmen Glucokortikoide sowohl die zelluläre Aufnahme von Glucose als auch die Lipogenese in Adipozyten und die Ausschüttung von Prostaglandinen, Interleukinen, Lymphokinen, Histamin und Serotonin.

Im Hinblick auf DC führen Glucokortikoide zu einer Verringerung der Expression von major histocompatibility complex (MHC) II Proteinen und einer daraus folgenden geringeren T-Lymphozyten Aktivierung. Zudem kommt es zu einer Abnahme pro-inflammatorischer Interleukine wie IL-1, IL-6, IL-12 und Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Im Gegenzug wird die mRNA Expression des anti-inflammatorischen IL-1ra erhöht [25].

### **1.2.2 Marathon als Stressmodell**

In den letzten Jahrzehnten erfreut sich der Marathonlauf, auch bei Freizeitläufern, immer größerer Beliebtheit. So nahmen im Jahr 2010 am München Marathon etwa 8000 Läufer teil. Den New York City Marathon, einen der größten Marathonläufe der Welt, beendeten im

gleichen Jahr über 43.000 Läufer und Läuferinnen. Im Jahr 2011 erhöhte sich diese Zahl nochmals auf über 45.000 Starter [26-28].

Regelmäßiger moderater Ausdauersport senkt das Risiko der koronaren Herzerkrankung [29]. Mögliche Mechanismen sind dabei eine Reduktion etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ II, LDL-Cholesterin, Übergewicht und oxidativer Stress. Zudem führt moderater Ausdauersport zu einer positiven Beeinflussbarkeit des Immunsystems. Im Gegensatz zu den positiven Effekten muss berücksichtigt werden, dass durch Überbelastung und Übertraining die Gefahr, einen Myokardinfarkt zu erleiden, erhöht ist [29-31].

Die meisten der insgesamt jedoch sehr seltenen plötzlichen Herztode im Rahmen von Ausdauersportarten finden bei Wettkämpfen statt. Während bei jüngeren Athleten unter 35 Jahren die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) sowie angeborene Herzfehler die Hauptursachen darstellen, steht bei älteren Sportlern die koronare Herzkrankheit im Vordergrund [29, 32-33].

Eine akute körperliche Extrembelastung, wie sie die Teilnahme an einem Marathonlauf darstellt, ist für den menschlichen Organismus sowohl eine physische wie auch psychische Belastung, die zu erhöhten Katecholamin- und Glukokortikoidwerten führt und zudem einen starken Einfluss auf das Immunsystem hat [34]. Es gibt Hinweise darauf, dass bei länger andauernden körperlichen Belastungen die Glukokortikoid- gegenüber der Katecholaminwirkung in den Vordergrund tritt [35]. In mehreren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass extreme körperliche Belastung eine Veränderung der Leukozyten hinsichtlich Anzahl und Funktion induziert. Bereits 1901 befasste sich Larrabbe mit dem Einfluss von Marathonlaufen auf das Immunsystem; er detektierte an vier Probanden, die den Boston Marathon absolvierten, eine Leukozytose nach Beendigung des Laufes [36]. Daten bezüglich der Ausschüttung von Zytokinen belegten, dass zunächst pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  und IL-6 als Antwort auf die körperliche Belastung ausgeschüttet werden. In der Folge werden anti-entzündliche Zytokine wie IL-10 und IL-1ra sezerniert [34]. Woods et al. konnten in Tierversuchen zeigen, dass bei Mäusen, die exzessiv in Laufrädern körperlich belastet wurden, die MHC-II Expression der antigenpräsentierenden Zellen erniedrigt ist. Die Herunterregulation der MHC-II Expression auf der Zelloberfläche führt in der Folge zu einer verringerten T-Lymphozytenaktivierung. Nach Meinung des Autors könnten die durch physischen Stress erhöhten Glukokortikoidwerte ursächlich sein [37].

Aufgrund der Unterdrückung der Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten kurz nach exzessiver körperlicher Belastung kommt es vermehrt zu viralen und auch bakteriellen Infekten, wobei besonders Infektionen der oberen Atemwege im Vordergrund stehen – der sogenannte open window Effekt [35, 38].

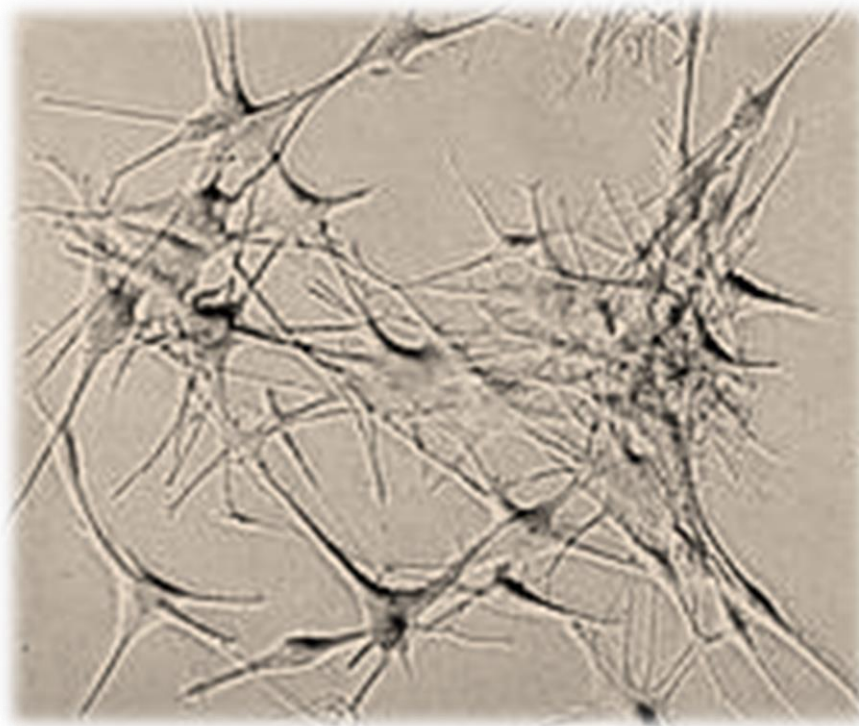
Es ist bekannt, dass eine Reihe bakterieller und viraler Krankheitserreger wie Chlamydia pneumoniae, Zytomegalievirus, respiratory syncytial Virus und Influenzavirus bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine Rolle spielen können [39-42]. Lokal begrenzte Infektionen können entweder direkt mit der Gefäßwand interagieren oder indirekt über eine generalisierte Aktivierung des Immunsystems. Laut Muehlenstein et. al. können systemische Infektionen, die selbst nicht in der Gefäßwand stattfinden, bereits vorbestehende atheromatöse Plaques durch eine verstärkte T-Lymphozyten Aktivierung und weitere Entzündungsreaktionen destabilisieren und so zur Ruptur der Plaques führen [43]. Beobachtungen in epidemiologischen Studien weisen darauf hin, dass die jährliche Gripeschutzimpfung und die damit verbundene Verringerung der Inzidenz der Grippeinfektionen zu einer teilweisen Senkung des Herzinfarkttrisikos führen kann [33].

Neben dem physischen Stress stellen ein Marathonlauf und die lange Vorbereitungszeit zudem auch eine psychische Belastungssituation für die Athleten dar. Länger andauernder psychischer Stress wurde bereits in einigen Studien als Risikofaktor für Atherosklerose und koronare Herzkrankheit identifiziert [44-45]. So beschreiben etwa Hamer et. al. im Rahmen der Whitehall II Studie, dass ein erhöhter Kortisolspiegel als Antwort auf psychischen Stress bei den Probanden ein höheres Risiko einer koronaren Kalzifikation, respektive einer koronaren Herzkrankheit zur Folge hat [45].

## 1.3 Dendritische Zellen

### 1.3.1 Überblick über die dendritischen Zellen (DC)

DC sind aus dem Knochenmark stammende antigen-präsentierende Zellen, die ihren Namen aufgrund ihrer weitverzweigten Fortsätze, die im mikroskopischen Bild an einen Baum (*griechisch: Dendron*) erinnern, erhielten.



**Abbildung 2: Darstellung von DC im Elektronenmikroskop (Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik)**

DC, ubiquitär im menschlichen Körper vorhanden, sind die effektivsten antigen-präsentierenden Zellen. Obwohl sie mengenmäßig nur eine geringe Anzahl der Abwehrzellen im peripheren Blut des menschlichen Körpers darstellen, bilden DC, dank der Aufnahme von Krankheitserregern - vermittelt über toll-like Rezeptoren (TLR) - der Prozessierung und der Präsentation der Antigene für T-Lymphozyten eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [46-47]. Nach dem Antigenkontakt kommt es zu einer Reifung der Zellen in deren Verlauf sie sich von antigenaufnehmenden zu antigenpräsentierenden Zellen umwandeln, wobei die Antigenaufnahmekapazität abnimmt. Hierbei werden vermehrt MHC-Proteine an der Oberfläche expremiert und die Chemokin- und Zytokinproduktion wird verstärkt [46-48]. Die Antigene müssen, damit sie von T-Lymphozyten erkannt werden können, erst in den DC prozessiert und anschließend mittels

MHC-Rezeptoren und weiteren Ko-Stimulatoren, im Besonderen den Cluster of Differentiation (CD) Faktoren 40, 83 und 86, den T-Lymphozyten präsentiert werden [46, 48]. Eine einzige DC reicht bereits aus, um bis zu 3000 T-Lymphozyten zu stimulieren [48]. Die hohe Anzahl an stimulierten T-Lymphozyten - im Vergleich mit anderen antigenpräsentierenden Zellen - ist erklärbar durch eine bis zu 100-fach höhere Anzahl von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche stimulierter DC [48].

Es gibt verschiedene DC Subpopulationen. Shortman et al. beschreiben prädendritische Zellen, konventionelle ausgereifte DC und inflammatorische DC [49]. Ueno et. al. benennen zwei ontogenetische Hauptwege für die DC Entwicklung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Der eine Weg generiert myeloide DC (mDC), während der andere zu plasmazytoiden DC (pDC) führt. Diese zwei unterschiedlichen Subtypen von DC im Blut, die in dieser Arbeit untersucht werden, lassen sich durch Oberflächenmarker klassifizieren [50].

Auf ihrer Zelloberfläche sind mDC unter anderem BDCA (blood dendritic cell antigen) 1 positiv. BDCA 1 ist eine andere Beschreibung für CD1c [51]. Die physiologische Rolle der im Blut zirkulierenden mDC ist noch nicht restlos geklärt; zum einen stellen sie ein Reservoir dar, um ins Gewebe abgewanderte mDC zu ersetzen. Zum anderen könnten sie als Sensor für Antigene im Blut in Betracht kommen, oder aber auch beide Aufgaben erfüllen.

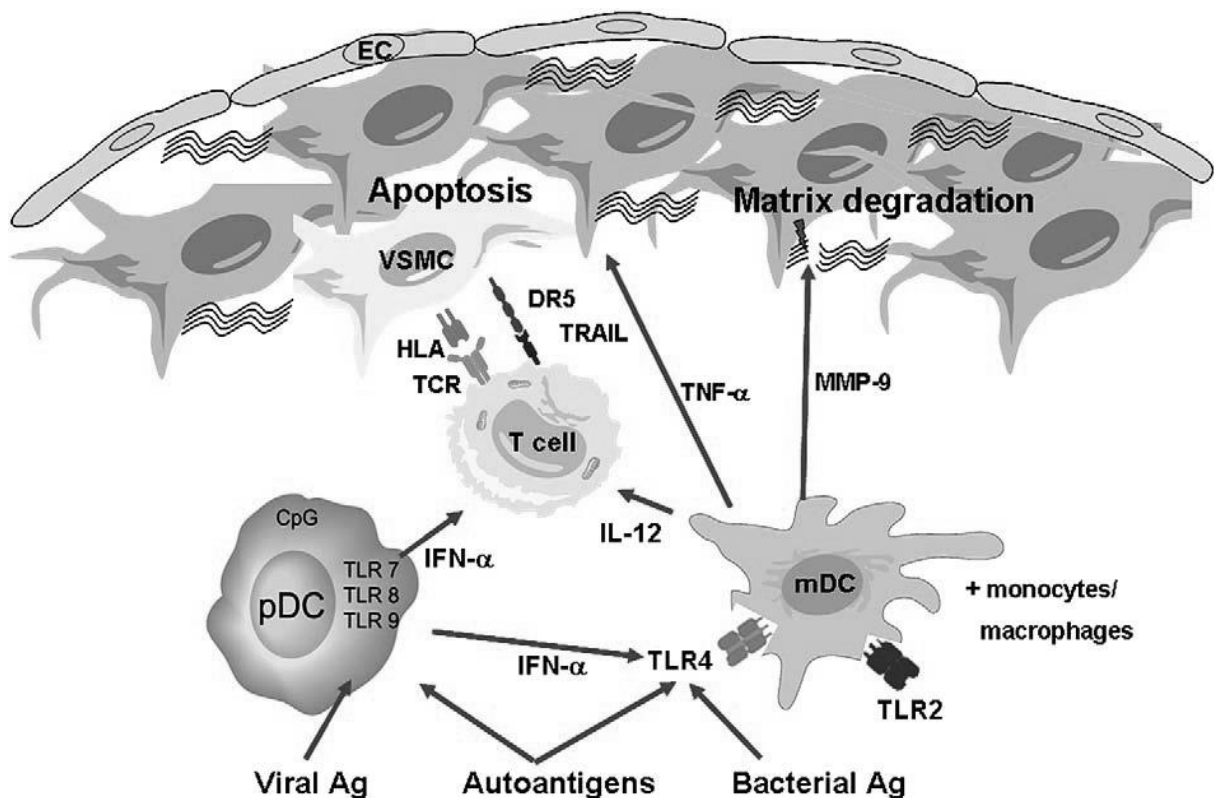
Die unreifen, also noch nicht in Antigenkontakt getretenen mDC, präsentieren zur Antigenaufnahme auf ihrer Zelloberfläche die TLR 1, 2, 4, 5, 6, 8; sie sind dadurch eher auf bakterielle Keime spezialisiert [52].

Unreifen pDC, welche BDCA 2 (CD 303) als Oberflächenmarker auf ihrer Zelloberfläche präsentieren [53], reagieren mittels der bei ihnen vorrangig vertretenen intrazellulären TLR 7 und 9 vornehmlich auf virale Erreger. Nach Kontakt mit viralen Erregern schütten sie große Mengen von IFN- $\alpha$  aus und differenzieren sich in Zellen mit typischer DC Morphologie und Funktion.

Der Weg, auf dem die im Blut zirkulierenden DC in die sekundären Lymphorgane gelangen, scheint zwischen mDC und pDC zu differieren. pDC wandern direkt in das Lymphgewebe, wohingegen mDC über den Ort der Entzündung in das Lymphgewebe einwandern [50]. Während nach Antigenkontakt, Reifung und Wanderung in das lymphatische Gewebe die mDC durch die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-6 und IL-12 eine Th1-Lymphozyten vermittelte Immunantwort hervorrufen, führen die pDC mittels INF- $\alpha$  zu einer Aktivierung der Th2-Lymphozyten [52-54].

Bei Schlaganfällen und Herzinfarkten findet sich eine erniedrigte Zahl zirkulierender BDCA1 positiver DC [55]. Zudem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer erniedrigten Zahl an BDCA1+ DC und einer Häufung von Infektionen.

BDCA2 positive DC spielen hingegen bei einigen Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes eine entscheidende Rolle und induzieren, wie oben bereits erwähnt, über TLR 7 eine antivirale Immunabwehr [56].



**Abbildung 3: Die Rolle von DC in atherosklerösen Plaques:** mDC werden durch Autoantigene und bakterielle Antigene, die an TLR 2 und TLR 4 binden aktiviert. Aktivierte mDC produzieren Effaktormoleküle wie Metalloproteinasen, die die extrazelluläre Matrix zerstören. Desweiteren aktivieren sie mittels IL-12 zytotoxische T-Lymphozyten und induzieren über TNF- $\alpha$  die Apoptose glatter Muskelzellen der Gefäßwand. pDC werden durch intrazelluläre Bindung von viralen Antigenen an TLR 7 und TLR 9 aktiviert. Aktivierte pDC produzieren hohe Mengen IFN- $\alpha$ , welches zu einer erhöhten TLR 4 Expression anderer APC und die Expression des proapoptotischen TRAIL-Moleküls in T-Lymphozyten führt. Die TRAIL exprimierenden T-Lymphozyten haben die Fähigkeit bei glatten Muskelzellen und Endothelzellen, die DR5 an ihrer Oberfläche tragen die Apoptose zu induzieren. EC = Endothelzelle, VSMC = glatte Muskelzelle, DR5 = death Rezeptor 5, TCR = T-Zell Rezeptor, HLA = human leukocyte antigen, MMP-9 = Metalloprotease 9, CpG = bakterielles und virales DNA-Motiv, TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand (nach Niessner et. al., Clinical Immunology 2010)

### **1.3.2 Immunmodulatorisches Potential von Flavonoiden auf dendritische Zellen**

Flavonoide haben eine anti-inflammatorische Wirkung auf die DC. Im Rahmen der Arteriosklerose sind Flavonoide von großem Interesse, da sie die Oxidation von LDL zu oxLDL verringern können [57]. So zeigt eine vierwöchige Einnahme von 1 Gramm Quercetin pro Tag eine Verringerung der durch oxLDL hervorgerufene Differenzierung dendritischer Zellen, eine geringere Adhäsion von DC an Endothelzellen sowie eine Reduktion der Phagozytosekapazität der DC (in-vitro Experiment). Somit könnten die durch Flavonoide hervorgerufenen Veränderungen der DC auch eine Therapieoption bei Atherosklerose darstellen. In vivo senkt Quercetin zudem die Anzahl zirkulierender pDC und senkt die Konzentration von systemischen asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) im Blutplasma. Diese Effekte lassen vermuten, dass Flavonoide auch zu einer Stabilisierung atheromatöser Plaques beitragen könnten [14].

Ein häufiges Problem, das bei Sportlern im Anschluss an extreme Belastungen und bei Übertraining auftritt, sind Infekte der oberen Atemwege. Nieman et. al. konnten zeigen, dass Sportler, die im Vorfeld der körperlichen Belastung Quercetin zu sich genommen hatten, signifikant weniger Infekte der oberen Atemwege aufweisen als Teilnehmer einer Placebogruppe. Allerdings ist es ihnen nicht gelungen der Veränderung in der Infektanfälligkeit ein Korrelat auf zellulärer Ebene zuzuordnen [35, 58].

Interessant wäre hier die Rolle der pDC, die bei der Immunreaktion gegenüber viralen Krankheitserregern eine wichtige Rolle, vermittelt über TLR 7, spielen. Besonders bei Infekten der oberen Atemwege, die häufig durch Viren, wie das Influenzavirus und das Respiratory syncytial Virus, hervorgerufen werden, ist der Einfluss von Polyphenolen auf die Genexpression des TLR 7 bei pDC von Interesse.



## **1.4 Toll-like Rezeptoren**

### **1.4.1 Funktionsweise der Toll-like Rezeptoren (TLR)**

TLR sind eine Familie von Transmembranproteinen, die eine wichtige Rolle für das angeborene Immunsystem bei der Erkennung und Bekämpfung von verschiedenen Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen spielen. Der Name Toll wurde erstmals 1991 für einen Oberflächenrezeptor erwähnt [59], in der Zwischenzeit sind zehn unterschiedliche TLR beim Menschen bekannt. TLR sind auf der Oberfläche zahlreicher humaner Zellen, darunter Makrophagen und DC, zu finden [60-61].

Jeder dieser TLR erkennt, wie in Abbildung 4 dargestellt, unterschiedliche pathogen-assoziierte molekulare Muster verschiedener Krankheitserreger [62]. Die in dieser Arbeit genauer betrachteten TLR sind TLR 2, 4 und 7.

Der TLR 2 erkennt gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* [63] und *Streptococcus pneumoniae* [64].

Das Lipopolysaccharid (LPS), eine Hauptkomponente der Zellwand gram-negativer Bakterien, ist der Hauptligand des TLR 4, weitere Liganden sind unter anderem Taxol [65] und ein Fusionsprotein des Respiratory Syncytial Virus [66].

Im Gegensatz zu den beiden oben genannten TLR findet sich der TLR 7 intrazellulär und erkennt dort Einzelstrang-RNA; er spielt eine besondere Rolle in der Erkennung von Viren, insbesondere der Humanen Immundefizienz-Viren (HIV), Dengueviren und Influenzaviren [67-68].

Die Wirkweise der einzelnen TLR wurde mit Hilfe von knock-out Mäusen erbracht [60]. Nach Bindung eines Liganden an TLR wird eine Kaskade initiiert, in deren Verlauf fünf wichtige Adapterproteine involviert sind. Besonders hervorzuheben ist der myeloid differentiation factor 88 (MyD 88), der von allen TLR mit Ausnahme des TLR 3, benutzt wird. Am Ende der Kaskade steht für die TLR 2 und 4 eine Hochregulation der Zytokine IL-1, IL-6 und des TNF- $\alpha$ . Die Aktivierung des TLR 7 führt zur Produktion von IFN- $\alpha$  [68-69].

Mittels Zytokinproduktion spielen TLR eine entscheidende Rolle bei der Reifung und Aktivierung von DC. Je nach TLR Aktivierung induzieren die gereiften DC unterschiedliche T-Lymphozytenantworten. Somit bilden TLR eine wichtige Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität [61].

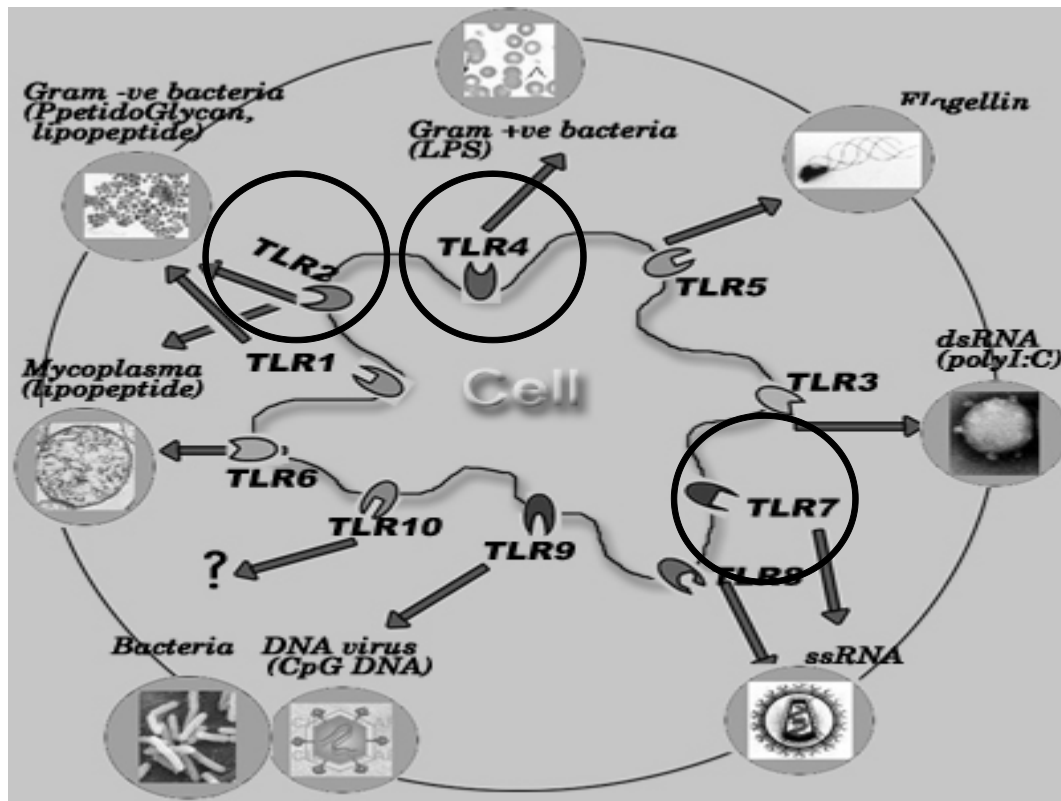


Abbildung 4: Hauptliganden der TLR: TLR 1 = Peptidoglykane, Lipoproteine, TLR 2 = Peptidoglykane, Lipoproteine (gram-positive Bakterien), TLR 3 = Doppelstrang-DNA, TLR 4 = lipopolysaccharide (gram-negative Bakterien), TLR 5 = Flagellin, TLR6 = Lipoproteine, TLR 7 = Einzelstrang-RNA, TLR 8 = Einzelstrang-RNA, TLR 9 = Viren und Bakterien mit CpG DNA-Motiv (nach Lata S, Raghava GP (2008). PRRDB: A comprehensive database of Pattern-Recognition Receptors and their ligands. BMC Genomics, 18;9:180)

#### 1.4.2 Auswirkung von körperlicher Betätigung auf Toll-like Rezeptoren und dendritische Zellen

Nickel et. al. untersuchten den Einfluss von Ausdauertraining und körperlicher Extrembelastung (im Rahmen eines Marathons) auf die Modifikation der DC und TLR bei übergewichtigen Probanden. Hierbei konnte eine Zunahme der mDC, eine Abnahme der pDC und eine erhöhte Genexpression von TLR 4 und 7 durch aerobes Ausdauertrainings bei übergewichtigen Probanden beobachtet werden. Die Hochregulation der TLR weist auf eine mögliche erhöhte Kapazität der angeborenen Immunabwehr durch Ausdauertraining hin [54]. Direkt nach dem Marathon fanden sich eine Erhöhung der mDC, ein Abfall der pDC sowie eine deutliche Abnahme der TLR 7 Genexpression direkt nach dem Marathon mit einer konsekutiven Proteinabnahme 24 Stunden später. Diese Veränderungen zeigten sich bei den Probanden unabhängig von Trainingsumfang und Körpergewicht [35, 70].

## **2 Material, Methoden und Studiendesign**

### **2.1 Studiengrundlage**

#### **2.1.1 Studienintention**

Die **BeMaGIC** Studie (**B**eer **M**arathon **G**enetics **I**nflammation and **C**ardiovascular System Study) wurde von unserer Arbeitsgruppe (Laborleitung PD Dr. U. Wilbert-Lampen, Dr. T. Nickel, Medizinischen Klinik I) in Kooperation mit der Sportmedizinischen Abteilung der Technischen Universität München (Prof. Dr. M. Halle) durchgeführt. Ziel der Studie war die Identifizierung eines möglichen Einflusses von in entalkoholisiertem Weißbier enthaltenen Polyphenolen auf das, durch schweren körperlichen Stress im Rahmen eines Marathonlaufes, belastete Immunsystem zu untersuchen.

Zum einen wurden Veränderungen der relativen Anzahl im Blut zirkulierender DC und die Genexpression der TLR 2,4 und 7 vor, während und nach dem Marathon bei gesunden, sportlichen Probanden identifiziert. Zudem analysierten wir mögliche Auswirkungen einer dreiwöchigen Einnahme von flavonoidreichem entalkoholisiertem Weißbier während der Vorbereitungs-, Marathon- und Erholungsphase auf die relativen Veränderungen der DC und TLR.

Die **BeMaGIC** Studie wurde als Placebo-kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie konzipiert und von Juni bis Oktober 2009 durchgeführt. Aufgrund der zirkadianen Beeinflussung der von uns untersuchten Parameter konnten in unsere Untersuchung nur diejenigen Probanden eingeschlossen werden, die sich ausschließlich zu Untersuchungsterminen zwischen 8.00 und 12.00 Uhr vorstellten. Von diesen Probanden verblieben nach Durchlaufen aller fünf Termine noch 105.

Der Ethikantrag wurde von der Sportmedizinischen Abteilung der Technischen Universität München eingereicht und gebilligt:

approval reference number: 2384/09, University Hospital Klinikum rechts der Isar, Munich, Germany

#### **2.1.2 Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie**

Das Protokoll sah für jeden der Probanden insgesamt 5 Untersuchungstermine (im Folgenden „Visiten“) vor.

Die Studie erfolgte zu zwei Zeiträumen: 09.06.2009 – 08.07.2009 (Teilnahme am Münchner Wissenschaftsmarathon) und 11.09.2009 – 14.10.2009 (Teilnahme am München Marathon).

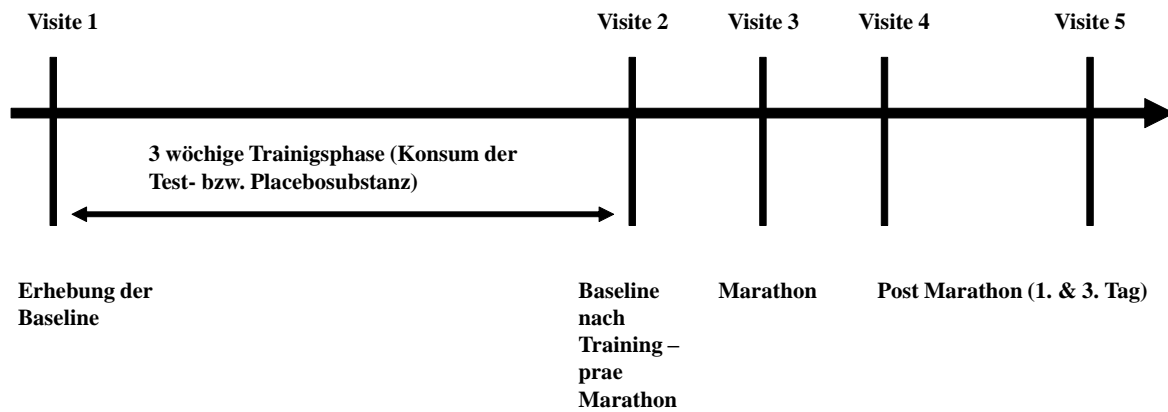
Visite 1 (siehe Abbildung 5) erfolgte bei beiden Läufen etwa einen Monat vor dem Marathon (09.06. – 10.06.2009 sowie 11.09. – 17.09.2009). Nachdem alle Probanden auf Ein- und Ausschlusskriterien überprüft, aufgeklärt und ihr Einverständnis schriftlich erklärt hatten, wurden bei dieser Eingangsuntersuchung Baseline Werte für alle im Protokoll vorgesehenen Parameter erhoben. Die Probanden wurden randomisiert und doppelverblindet in zwei gleichstarke Gruppen eingeteilt (Team Blau – Team Rot) und der Randomisierung entsprechend mit Studien- beziehungsweise Placebogetränken für die dreiwöchige Trainingsphase versorgt. Um Störeinflüsse zu vermeiden, wurden die Probanden darauf hingewiesen, während der Trainingsphase auf besonders flavonoidhaltige Nahrungsmittel zu verzichten und über den einheitlichen Starttermin des Konsums sowie die geplante Trinkmenge (jeweils exakt drei Wochen vor dem Marathon – 1,5 Liter/Tag) unterrichtet. Den Probanden wurden zur exakten Dokumentation des individuellen Trinkverhaltens Trinkprotokolle ausgehändigt.

Visite 2 (siehe Abbildung 5) fand in der Woche vor dem Marathon statt (01.07. – 04.07.2009 sowie 06.10. – 10.10.2009), aus logistischen Gründen war ein einziger Untersuchungstag nicht möglich, somit ergibt sich ein geringer Unterschied in der Anzahl der Interventionstage zwischen Visite 1 und Visite 2. Das Untersuchungsprozedere im Bezug auf unsere Fragestellung war dem von Visite 1 gleich.

Visite 3 (siehe Abbildung 5) beinhaltet die Untersuchungen unmittelbar nach Zieleinlauf am jeweiligen Marathontag (05.07.2009 sowie 11.10.2009). Um den akuten Effekt der Belastung abzubilden, wurden alle Probanden sofort nach Zieleinlauf untersucht.

Visite 4 (siehe Abbildung 5) fand am jeweiligen Folgetag statt (06.07.2009 sowie 12.10.2009) und bestand aus der wiederholten Messung der schon bei den vorangegangenen Testtagen erhobenen Parameter.

Visite 5 (siehe Abbildung 5), drei Tage nach dem Marathonlauf (08.07.2009 sowie 14.10.2009), beinhaltete eine exakte Wiederholung der Visite 4.



**Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie**

### **2.1.3 Einschlusskriterien**

- Männliches Geschlecht
- Mindestalter 18 Jahre
- Höchstalter 60 Jahre
- Keine aktuellen Erkrankungen
- Mindestens ein Halbmarathon absolviert
- Schriftliche Einverständniserklärung

### **2.1.4 Ausschlusskriterien**

- Manifeste Herzerkrankung, insbesondere Angina Pectoris
- Diabetes mellitus Typ I
- Diabetes mellitus Typ II (medikamentös therapiebedürftig oder insulinpflichtig)
- Muskuloskelettale Erkrankungen
- Psychiatrische Erkrankungen
- Neoplasien
- Akute oder chronische Infekte
- Alkoholismus oder Z.n. Alkoholabhängigkeit
- Pharmaka oder Phytopharmaka mit erwiesenem oder vermuteten Einfluss auf den Immunstatus
- Medikamente mit Wirkung auf Thrombozytenfunktion
- Malabsorptionssyndrome
- Allergische Erkrankungen

### **2.1.5 Studienziel und Endpunkte**

Ziel der Studie war zum einen eine mögliche Beeinflussbarkeit von körperlicher Extrembelastung auf das Immunsystem zu untersuchen. Zum anderen stellte sich die Frage, ob Flavonoide hierbei einen positiven Effekt ausüben können. Konkrete Endpunkte waren dabei Parameter, die eine Veränderung im Immunstatus der Testpersonen widerspiegeln. Im Detail waren dies die relative Zahl der BDCA 1 und BDCA 2 positiven DC Subpopulationen sowie die Genexpression der TLR 2, 4 und 7.

### 2.1.6 Studiengetränk

Das Studiengetränk wurde von der Brauerei Erdinger Weißbräu in Kooperation mit der Technischen Universität München Weihenstephan in in-vitro Testreihen entwickelt. So enthielt das Testgetränk, in der Grundzusammensetzung an entalkoholisiertem Weißbier angelehnt, einen verringerten Gehalt an Kohlensäure, sowie einen in vorherigen Studien optimierten Gehalt an Flavonoiden.

Stoffgruppe	Stoff/Abkürzung	Menge pro Liter Erdinger Alkoholfrei
<b>Vitamine</b>	Vitamin B1 (Thiamin)	0,29 mg
	Vitamin B2 (Riboflavin)	0,25 mg
	Vitamin B3 (Niacin)	5,3 mg
	Vitamin B5 (Pantothensäure)	0,46 mg
	Vitamin B6	0,45 mg
	Vitamin B9/11 (Folate)	461 µg
	Vitamin B12 (Cobalamin)	217 µg
	Vitamin H (Biotin)	6,3 µg
<b>Mineralstoffe</b>	Calcium	53,5 mg
	Magnesium	57 mg
	Kalium	383 mg
	Natrium	4,1 mg
	Phosphor	274 mg
<b>Spurenelemente</b>	Mangan	0,2 mg
	Silizium	13 mg
	andere	in Spuren
<b>Eiweiß</b>	Proteine	4,5 g
	Aminosäuren	in Spuren
<b>Kohlenhydrate</b>	Zucker (Fruktose, Glukose, Maltose, Saccharose, Maltotriose)	43,9 g
	verwertbare Kohlenhydrate	53 g
	Dextrine	17 g
<b>sonstiges</b>	Ballaststoffe	1,8 g
	Alkohol	0,4 % Vol
	Polyphenole (Gerbstoffe)	83 mg
	CO <sub>2</sub>	7,2 g
	Brennwert	250 kcal
	Osmolarität	302 mOsmol/kg

**Tabelle 1: Zusammensetzung des Studiengetränkes**

Die Polyphenolanalyse des Studiengetränkes durch das Fachgebiet Obstbau der Technischen Universität München am Wissenschaftszentrum Weißenstephan ergab am 4. September 2009 folgende Werte:

**Catechine und Proanthocyanidine (OPCs)**

Gallocatechin, Catechin	0,597 mg/l
Epicatechin	0,104 mg/l
Procyanidin	0,420 mg/l
sonstige OPCs	0,066 mg/l

**Derivate der Benzoesäure**

Vanillinsäure	0,196 mg/l
Syringasäure	0,539 mg/l

**Hydroxycimtsäuren**

p-Cumarsäure	0,196 mg/l
Ferulasäure	0,664 mg/l
Sinapinsäure	0,059 mg/l
sonstige Hydroxycimtsäuren	0,123 mg/l

**Flavanone und Chalkone**

Isoxanthohumol	0,498 mg/l
----------------	------------

**Flavon(ol)e**

Gesamtflavon(ol)e	0,694 mg/l
-------------------	------------

**Tabelle 2: Polyphenolanalyse des Studiengetränkes**



## **2.2 Materialien**

### **2.2.1 Geräte**

Blutentnahmesystem	Safety-Multifly 20 G - Sarstedt
Brutschrank	Binder
Durchflusszytometer	FACScan - Becton Dickinson
Heizblock	Thermostat 5320 – Eppendorf
Multipette	Multipette Plus – Eppendorf
PCR Gerät	TaqMan – Applied Biosystem
Photometer	Biophotometer – Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research 10, 20, 100, 200, 1000µl
Sterilbank	Steril GARD III Advance – Baker Company
Vertikalshaker	Promax 1020 – Heidolph
Vortexer	Reat top – Heidolph
Wasserdestillier	Milli-Q – Millipore
Zentrifugen	ROTINA 46 R – Hettich
	ROTINA 460R – Hettich
	Centrifuge 5804 – Eppendorf
	Centrifuge 5804 R – Eppendorf
	Centrifuge 5417 R – Eppendorf

### **2.2.2 Chemikalien Reagenzien**

Aqua dest.	eigene Herstellung
bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich (min 96%)
Desoxyribonukleotidtriphosphate (DNTP)	Qiagen
Ethanol	Merck
FACSflow	Becton Dickinson
Formalin 0,8%	Roti-Histofix von Roth
NaCl	
Oligonukleotide	Invitrogen
OMNiscript	Qiagen
PBS	Biochrom
PBS (für Durchflusszytometer)	Hauseigene Zubereitung
RDD Puffer	Qiagen

RLT Puffer	Teil von RNeasy kit – Qiagen
RNAse freies Wasser	Qiagen
RNAse Out	Invitrogen
RPE Puffer	Teil von RNeasy kit – Qiagen
RW1 Puffer	Teil von RNeasy kit – Qiagen
SYBRgreen	Qiagen
Vicoll	Lymphoprep - Axis Shield
β-6-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

### 2.2.3 Antikörper

BDCA1	CD1c (BDCA-1) – FITC human – MACS (130-090-507)
BDCA2	CD303 (BDCA-2) – PE human – MACS (130-090-511)
ISO	Mouse IgG1-PE – MACS (130-092-212) Mouse IgG2a-FITC – MACS (130-091-837)

### 2.2.4 Behältnisse und Reaktionszellen

Blutröhrchen	S-Monovette Serum Gel 9,0 ml – Sarstedt S-Monovette Kalium-EDTA 9,0 ml – Sarstedt
15 ml Röhrchen	BD Falcon
50 ml Röhrchen	BD Falcon
Caps	Eppendorf
Optische Messzellen (Photometer)	Uvette – Eppendorf
PCR Platten	MicroAmp Optical tubes – Applied Biosystems
Röhrchen Durchflusszytometrie	5 ml polystyrene round bottomed tubes – BD Falcon
Tubes zur RNA Isolierung	Quiagen

### **2.2.5 Statistik und Steuersoftware**

CellQuest 3.3

Endnote X3

ISIS Draw 2.1.4

Microsoft Excel 2007

SPSS 18.0

Windows NT/XP

## 2.3 Experimentelle Methodik

### 2.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren, das aufgrund von Lichtbrechung, Streuung und Fluoreszenz Rückschluss auf Größe, Granularität und Oberflächenantigene von Zellen ermöglicht. Dazu wird nach einem festgelegten Protokoll eine geeignete Zellsuspension erzeugt, eventuell erforderliche Färbungen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern vorgenommen, sowie eine Messung in einem entsprechenden Durchflusszytometer durchgeführt. Aus der Zellsuspension werden die Zellen von dem Gerät angesaugt, in PBS verdünnt und einzeln durch die Messkapillare gesaugt. Beim Durchfließen der Messkapillare werden die Zellen von einem Laser getroffen. Von mehreren Detektoren werden verschiedene Lichtqualitäten erfasst. Die Absorption des Lichtes durch die Zelle ist ein unscharfes Maß für die Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, FSC), die Brechung des Lichtstrahls gibt Anhalt über deren Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC). Außerdem kann mit dem Verfahren die Expression von Oberflächenantigenen beurteilt werden. Licht, das auf die antikörpermarkierten Oberflächenantigene trifft, führt zur Anregung und anschließenden Emission von Licht in spezifischen Wellenlängenbereichen, das im Falle unseres Gerätes von bis zu drei verschiedenen Detektoren aufgenommen werden kann (Fluoreszenz 1,2,3; FI1-FI3).

Nach der Blutentnahme wurde eine Suspension aus dem Vollblut hergestellt. Die bei der Untersuchung störenden Einfluss habenden Erythrozyten wurden mittels Zelllyse zum Platzen gebracht und die DC mit 2 Antikörpern, BDCA1 und BDCA2, angefärbt.

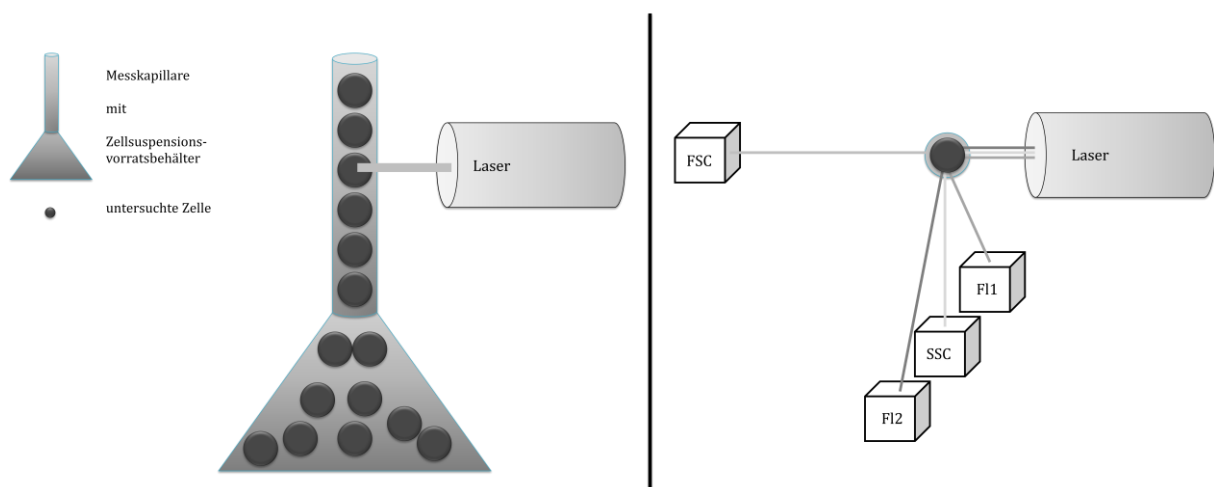


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie

Zunächst wurden die Antikörper pro Proband in zwei FACS Röhrchen vorgelegt. In eines dieser FACS Röhrchen wurden die Iso Antikörper pipettiert, in das zweite sowohl die BDCA1 als auch die BDCA2 Antikörper. In jedes Röhrchen wurde 250µl Vollblut hinzugegeben und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2ml Lysepuffer hinzugegeben und bei Raumtemperatur 10 Minuten im Dunkeln abgewartet bis die, bei der Messung störenden, Erythrozyten lysiert waren. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 1ml FACS Puffer hinzugefügt. Diese Suspension wurde nun für 5 Minuten bei 1500U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Zur Zellfixation wurden jeweils 500µl einer 0,8-prozentigen PBS-Formalinlösung hinzugegeben.

Die Suspension konnte nun im FACS-Scan der Firma Becton-Dickinson bei einer Flussrate von circa 1000 Zellen pro Sekunde gemessen werden. Es wurden pro FACS Röhrchen 500.000 Zellen gezählt.

Die Ergebnisse wurden mittels CellQuest 3.3 dargestellt und mittels Microsoft Excel und SPSS statistisch ausgewertet.

### **2.3.2 RNA-Isolierung und cDNA Umschreibung**

Die Verwendung von cDNA für die real-time PCR führt durch die Abbildung der mRNA Menge zu einem exakten Abbild der Genexpression einer Zelle. Bevor eine real-time PCR durchgeführt werden kann, muss die RNA zunächst gereinigt und anschließend in cDNA umgeschrieben werden. Das Vorliegen von RNasen, welche die RNA verdauen würden, macht eine Isolierung der RNA nötig.

Aus dem in EDTA-Röhrchen abgenommenen Blut wurden zunächst durch Zentrifugation des Blutes drei Zellpellets gewonnen und bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank bei - 80°C gelagert.

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen. Das Zellpellet wurde aufgetaut und zur Lyse in 325µl RLT-Buffer mit 35µl  $\beta$ -6-Mercaptopurin gegeben. Nach Auflösen des Zellpellets wurden 350µl 70-prozentiger Ethanol zum Stoppen der Lyse hinzugegeben. Die 700µl wurden in eine RNeasy spin column gegeben und für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Als nächsten Schritt wurden 350µl Waschpuffer RW1 auf die Membran der spin column gegeben und erneut bei 8000g für 15 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss wieder verworfen. Um noch vorhandene DNA Reste zu verdauen, wurde eine zuvor angesetzte Mischung aus 10µl DNase I und 70µl Buffer RDD auf die Membran gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut mit 350µl RW1 Puffer für 15 Sekunden bei 8000g gewaschen und der Durchfluss

verworfen. Nun wurden 500µl RPE-Puffer, der zuvor im Verhältnis 1 zu 5 mit reinem Ethanol verdünnt worden war, auf die Membran gegeben, die spin column für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Im Anschluss wurden erneut 500µl RPE Puffer auf die Membran pipettiert und für 2 Minuten bei 8000g zentrifugiert. Die längere Zentrifugation führte zu einem Trocknen der Membran und stellte so sicher, dass kein Ethanol mehr vorhanden war. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde die Membran auf ein neues Sammelgefäß gebracht und für 1 Minute bei höchster Drehzahl (22000g) zentrifugiert um Verunreinigungen durch etwaige Reste des RPE Puffers zu eliminieren. Als letzten Schritt wurden 30µl RNase freies Wasser auf die Membran aufgebracht, für eine Minute bei 8000g zentrifugiert, die Membran danach verworfen und der Durchfluss mit 30µl RNA-Lösung bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Die so gereinigte RNA wurde mit Omniscript Reverse Transcriptase von Qiagen in cDNA umgeschrieben. Omniscript Reverse Transcriptase ist ein rekombinantes heterodimeres Enzym, das in E.coli Bakterien exprimiert wird.

Zunächst wurde unter sterilen Konditionen 10µl Master Mix hergestellt, dieser setzte sich wie folgt zusammen: 2µl zehnfach konzentrierten Buffer RT, 2µl dNTP Mix in der Konzentration 5mM, 2µl Oligo-dT Primer in der Konzentration 10µM, 1µl RNase Inhibitor (10 Einheiten pro Mikroliter), 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase und 2µl RNase freies Wasser. Buffer RT, dNTP, Omniscript und RNase freies Wasser waren im Omniscript Reverse Transcriptase Kit von Qiagen enthalten. Die template RNA wurde aufgetaut und 1 µl davon, in der Verdünnung 1:50 mit destilliertem Wasser in ein Photometer gegeben und die Konzentration gemessen. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde unter der sterilen Werkbank in ein neues Eppendorfgefäß 1µg der template RNA gegeben. Um ein Gesamtvolumen von 10µl zu erhalten, wurde das dazu fehlende Volumen in Form von RNase freiem Wasser hinzugefügt. Hierzu wurden jeweils 10µl des MasterMix pro Eppendorfgefäß hinzugegeben.

Danach wurde die RNA zur Umschreibung in einem Heizblock bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Hierbei setzten sich die Primer an die mRNA und führten mit den vorliegenden Basen und unter Einfluss der RNA abhängigen DNA Polymeraseaktivität der Omniscript Reversen Transcriptase zu einem doppelsträngigen Hybrid aus cDNA und mRNA. Durch die RNase H Aktivität der Omniscript Reversen Trascriptase kam es zu einem Verdau der an die cDNA gebundenen mRNA. Im Anschluss daran kam es mittels der DNA abhängigen DNA Polymerase zur Herstellung der doppelsträngigen DNA. Nach den 60 Minuten Inkubation wurde die cDNA bei -20°C eingefroren und gelagert.

### 2.3.3 Real-time PCR

Die real-time PCR ist eine Methode, bei der Nukleinsäuren in mehreren Zyklen vervielfältigt werden. Aufgrund der Zugabe von fluoreszierenden Markern, wie in unserem Fall SYBR Green, ist eine quantitative Bestimmung der Nukleinsäuremenge möglich. Bei der Vervielfältigung der DNA werden interkalierende Farbstoffe in die DNA Stränge eingebracht. Wenn ein bestimmter Schwellenwert durch die fluoreszierende DNA erreicht wird, misst der PCR-Cycler bei welchem Zyklus dies der Fall ist. Je früher der Schwellenwert erreicht wird, desto höher war der Anfangsgehalt der zu bestimmenden RNA. Zu beachten ist hierbei die exponentielle Vermehrung der DNA in jedem Zyklus.

Die Genexpression der zu untersuchenden Gene wird in ein Verhältnis mit der Expression sogenannter Haushältergene, wie in unserem Fall, GAPDH, gesetzt und dann mittels  $\Delta\Delta C_T$  Methode ausgewertet.

Mittels real-time PCR wurden die Genexpressionen von GAPDH und der TLR 2,4 und 7 untersucht. Die verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

GAPDHs	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'
GAPDHas	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
Primer TLR2s	5'-GATGCCTACTGGGTGGAGAA-3'
Primer TLR2as	5'-CCACTTGCCAGGAATGAAGT-3'
Primer TLR4s	5'-TCCATAAAAGCCGAAAGGTG-3'
Primer TLR4as	5'-GATACCAGCACGACTGCTCA-3'
Primer TLR7s	5'-TTACCTGGATGGAAACCAGCTACT-3'
Primer TLR7as	5'-TCAAGGCTGAGAAGCTGTAAGCTA-3'

**Tabelle 3: rtPCR, verwendete Primer für GAPDH, TLR 2, 4 und 7**

Die Proben wurden auf den PCR Platten vorbereitet. Es wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix verwendet, der sich aus der HotStarTaq DNA Polymerase, dem QuantiTect SYBR Green PCR Puffer, dem Farbstoff SYBR Green I und einer passiven Referenzfärbung zusammensetzt. Pro Tube wurden 12,5µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1µl des Primers des zu untersuchenden Gens, 1µl der template cDNA, die zuvor bei Raumtemperatur aufgetaut worden war, sowie 10,5µl RNase freies Wasser zusammenpipettiert um eine Gesamtmenge von 25µl zu erhalten.

Die real-time PCR wurde im Taqman der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Zunächst wurde die Platte im Cycler für 15 Minuten auf 95°C erhitzt um die HotStarTaq DNA

Polymerase zu aktivieren. Im Anschluss liefen die Replikationszyklen. Ein Zyklus setzte sich aus 3 Schritten zusammen. Zunächst kam es zur Denaturierung bei 94°C für 15 Sekunden, danach zum Annealing bei 50-60°C für 30 Sekunden und zur Verlängerung bei 72°C für 30 Sekunden mit Abschluss des Zyklus. Insgesamt wurden pro real-time PCR zwischen 35 und 45 Zyklen durchlaufen.

Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt und zur Auswertung der Mittelwert beider Proben herangezogen. Nach Abschluss der real-time PCR wurden die C<sub>T</sub>-Werte mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode statistisch in Excel und SPSS ausgewertet [71].



## **2.4 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2003 und 2007 sowie PASW (Version 18.0). Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Test wurde untersucht, ob die erhobenen Daten normalverteilt waren. Bei in unserem Fall durchgehend nicht normalverteilten Daten wurde nichtparametrisch getestet. In verbundenen Situationen wurde mit dem Wilcoxon-Signed-Rank Test, in unverbundenen Situationen mit dem Mann-Whitney-U Test auf Signifikanzen getestet. Ein p-Wert von kleiner als 0.05 wurde als statistisch signifikant, von kleiner als 0.01 als statistisch hochsignifikant bezeichnet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind in den Diagrammen mit \* beziehungsweise #, hochsignifikante mit \*\* gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Durchflusszytometrische Analyse der dendritischen Subpopulationen im peripheren Blut

##### 3.1.1 Entwicklung der relativen Anzahl der mDC (BDCA1 positiv) im Blut während des Versuchszeitraumes

Insgesamt 105 Probanden durchliefen alle fünf Visiten bezüglich der Untersuchung der DC Subpopulationen. Bei der myeloiden Zellpopulation ergab sich folgendes Bild: Der Ausgangswert der Mediane betrug bei Visite 1 0.20% aller Leukozyten im Blut. Dieser Wert veränderte sich gegenüber Visite 2 nicht. Von Visite 2 auf Visite 3, den Marathontag, stieg der Median hochsignifikant auf 0.33% an. Am Tag nach dem Marathon (Visite 4) fiel er wieder hochsignifikant im Vergleich zum Vortag auf 0.27% ab, um bei Visite 5 signifikant auf 0.22% weiter abzufallen und sich somit dem Ausgangsniveau wieder anzugleichen (siehe Abbildung 7).

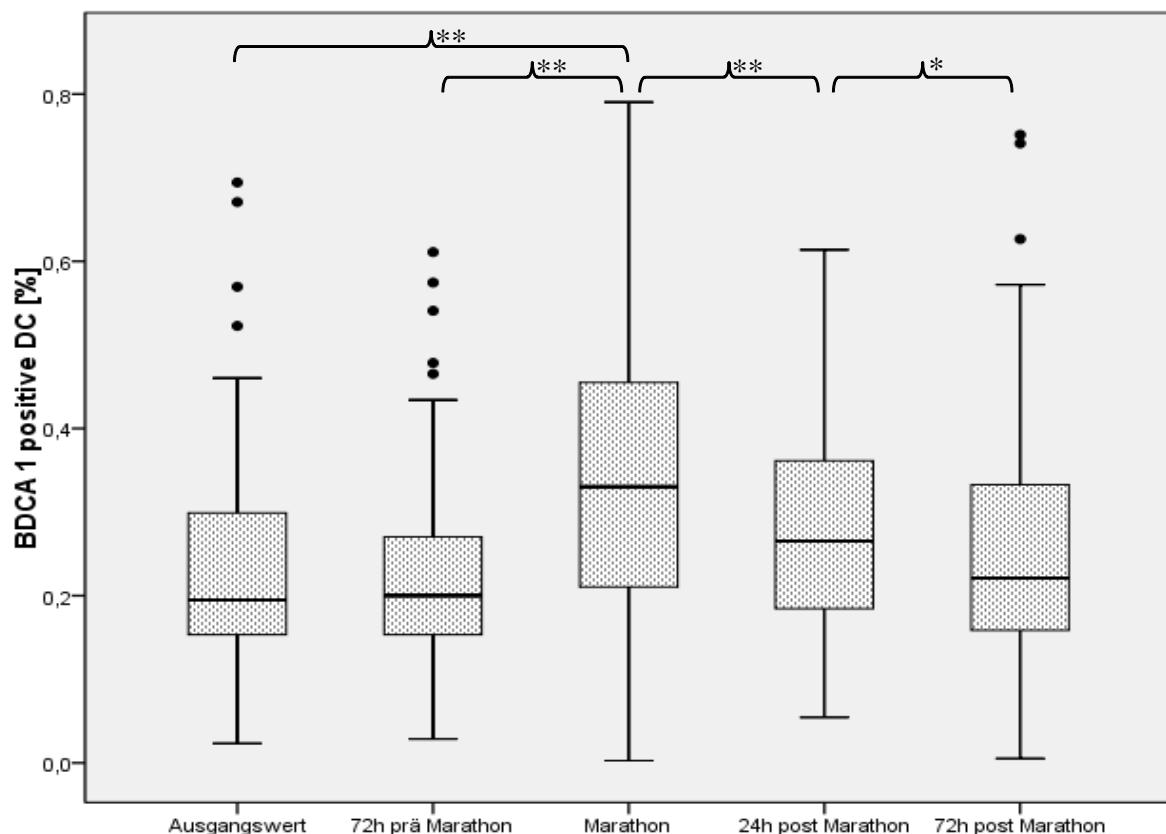


Abbildung 7: Anteil BDCA 1 positiver mDC an den im Blut zirkulierenden Leukozyten; n = 105 / \*  $p < 0.05$  / \*\*  $p < 0.01$

### 3.1.2 Vergleich der Verum- mit der Placebogruppe bezüglich der relativen Anzahl der mDC im peripheren Blut

Von den 105 untersuchten Läufern waren 47 Läufer der Verumgruppe und 58 Läufer der Placebogruppe zugeteilt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei Visite 4 (Tag nach dem Marathon). Hier war das Niveau der BDCA 1 positiven DC der Verumgruppe (0.33%) im Vergleich zur Placebogruppe (0.23%) signifikant erhöht. Bei den anderen Visiten zeigte sich kein signifikanter Unterschied beider Gruppen (siehe Abbildung 8). Beide Gruppen stiegen direkt nach dem Marathon gegenüber dem Vorwert bei Visite 2 signifikant an. Während es in der Placebogruppe bereits bei Visite 4, 24 Stunden nach dem Marathon, zu einem hochsignifikanten Abfall der BDCA1 positiven DCs kam, fielen die Werte der Verumtrinker erst verzögert 72 Stunden nach dem Marathon signifikant gegenüber dem Vorwert ab.

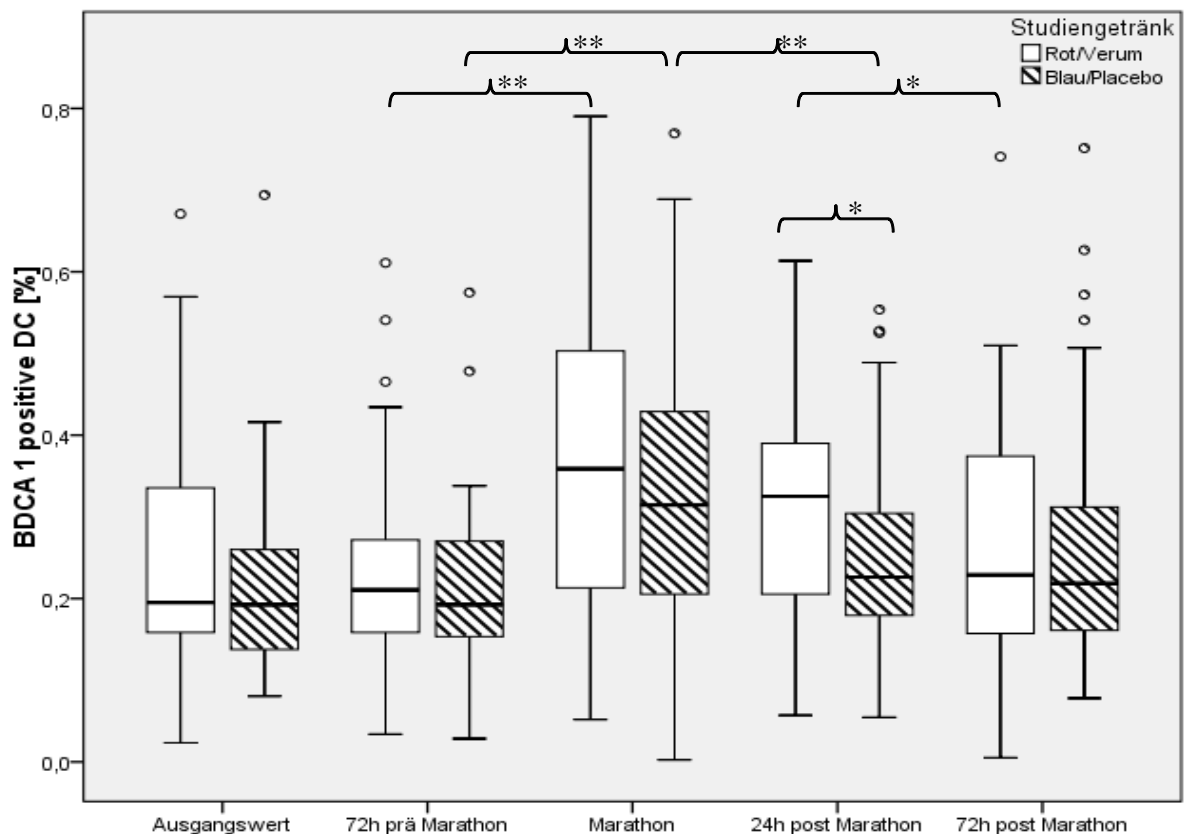


Abbildung 8: Vergleich von Verumgruppe zu Placebogruppe bezüglich BDCA 1 positiver mDC; Verumgruppe (weiß, n = 47) / Placebogruppe (schraffiert, n = 58); \*  $p < 0.05$  / \*\*  $p < 0.01$

### 3.1.3 Entwicklung der relativen Anzahl der pDC (BDCA2 positiv) im Blut während des Versuchszeitraumes

Bei den pDC, die BDCA 2 positiv sind, ergaben sich für die Mediane und ihre Veränderungen zu den jeweiligen Visiten folgende Werte: Der Ausgangswert betrug bei Visite 1 0,08% aller Leukozyten im Blut. Während der dreiwöchigen Trainingsphase erhöhte sich der Median bis zu Visite 2 hochsignifikant auf 0,12%. Am Marthontag zeigte sich nach dem Lauf bei Visite 3 ein hochsignifikanter Abfall des Median auf 0,03%. Tags darauf, bei Visite 4, stieg der Wert gegenüber dem Vortag wieder hochsignifikant auf 0,06% an. Von Visite 4 zu Visite 5 war keine Veränderung zu beobachten (siehe Abbildung 9).

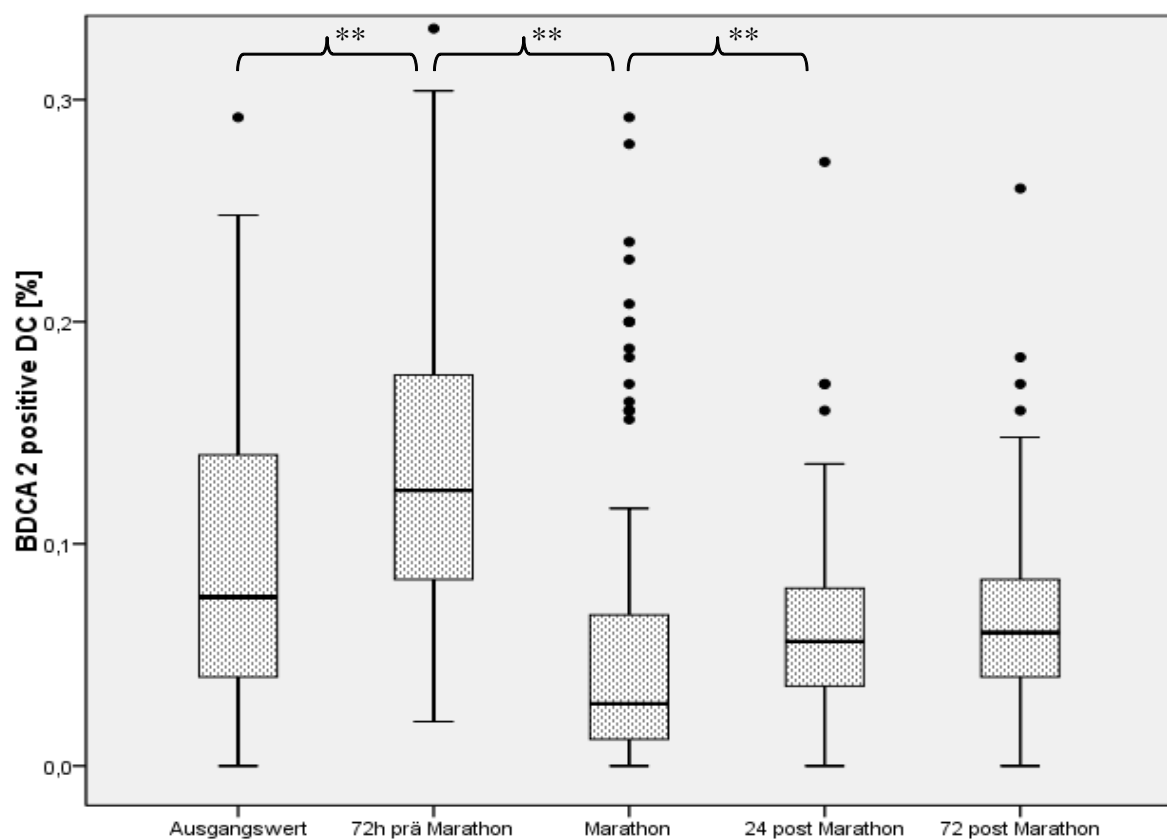


Abbildung 9: Relativer Anteil BDCA 2 positiver pDC an den im Blut zirkulierenden Leukozyten; n = 105 / \*\* p < 0.01

### 3.1.4 Vergleich der Verum- mit der Placebogruppe bezüglich der relativen Anzahl der pDC im peripheren Blut

Bei den Veränderungen des Anteils BDCA 2 positiver DC an den Leukozyten ergaben sich über den gesamten Studienablauf keine signifikante Differenz zwischen der Verum- und der Placebogruppe (siehe Abbildung 10). Beide Gruppen zeigten die bereits im Gesamtkollektiv dargestellten Veränderungen zwischen den jeweiligen Visiten (s.o.).

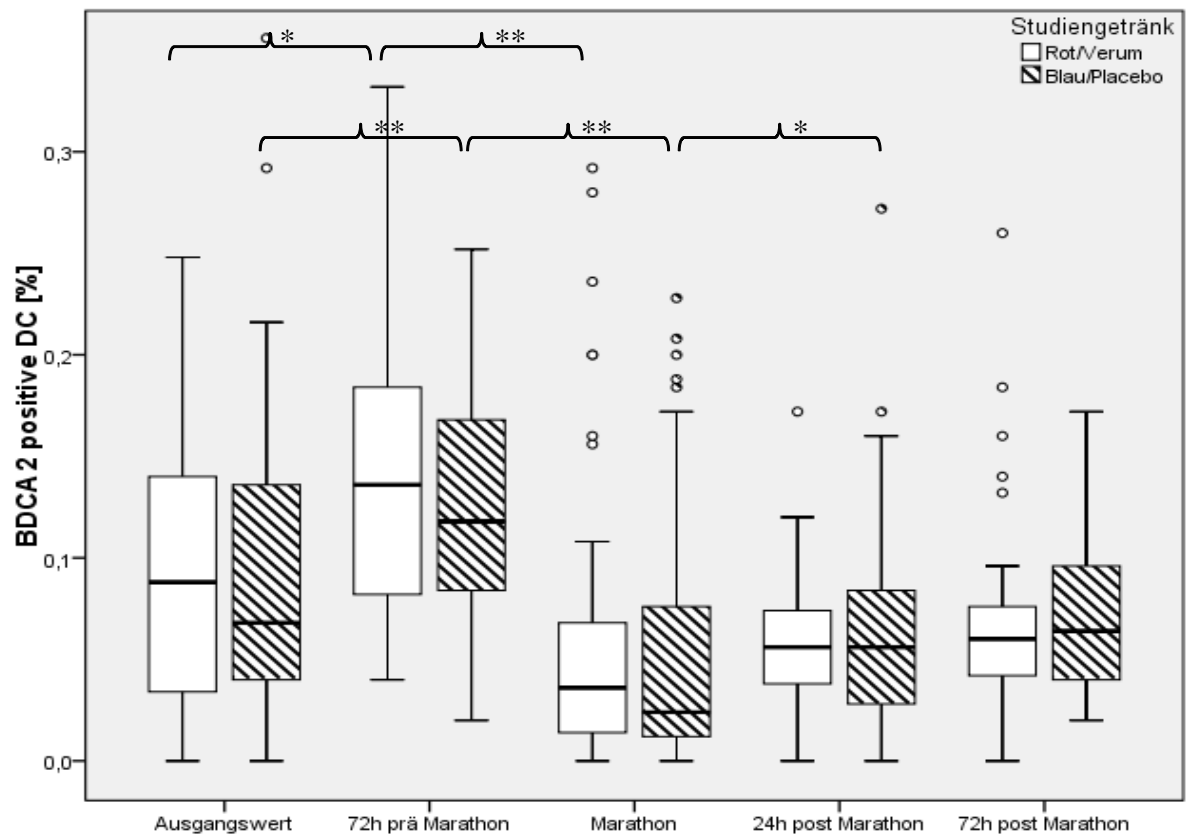


Abbildung 10: Vergleich Verumgruppe zu Placebogruppen bezüglich BDCA 2 positiver pDC; Verumgruppe (weiß, n = 47) / Placebogruppe (schraffiert, n = 58); \*  $p < 0.05$  / \*\*  $p < 0.01$

### 3.1.5 Untergliederung der Verumgruppe in 3 Subgruppen basierend auf der Trinkmenge

Die Verumgruppe wurde in eine Wenigtrinker-, eine Mitteltrinker- und eine Vieltrinkergruppe weiter aufgeteilt. Als Trennmengen wurden die Quartilen der Verumtrinkmenge genommen (siehe Abbildung 11). Da nur 42 der 47 Läufer, die das Verum erhalten hatten, ihre Trinktagebücher mit Angabe der Trinkmenge zurückgaben, sank die Gesamtheit auf 42. Der Gruppe der Wenigtrinker ( $< 1.00$  Liter/Tag) wurden somit 10 Läufer, der Gruppe der Mitteltrinker ( $1.00 - 1.25$  Liter/Tag) 22 Läufer und der Gruppe der Vieltrinker ( $> 1.25$  Liter/Tag) 10 Läufer zugeteilt (siehe Tabelle 1). Diese Einteilung ist sowohl für die Werte der DC und TLR gültig.

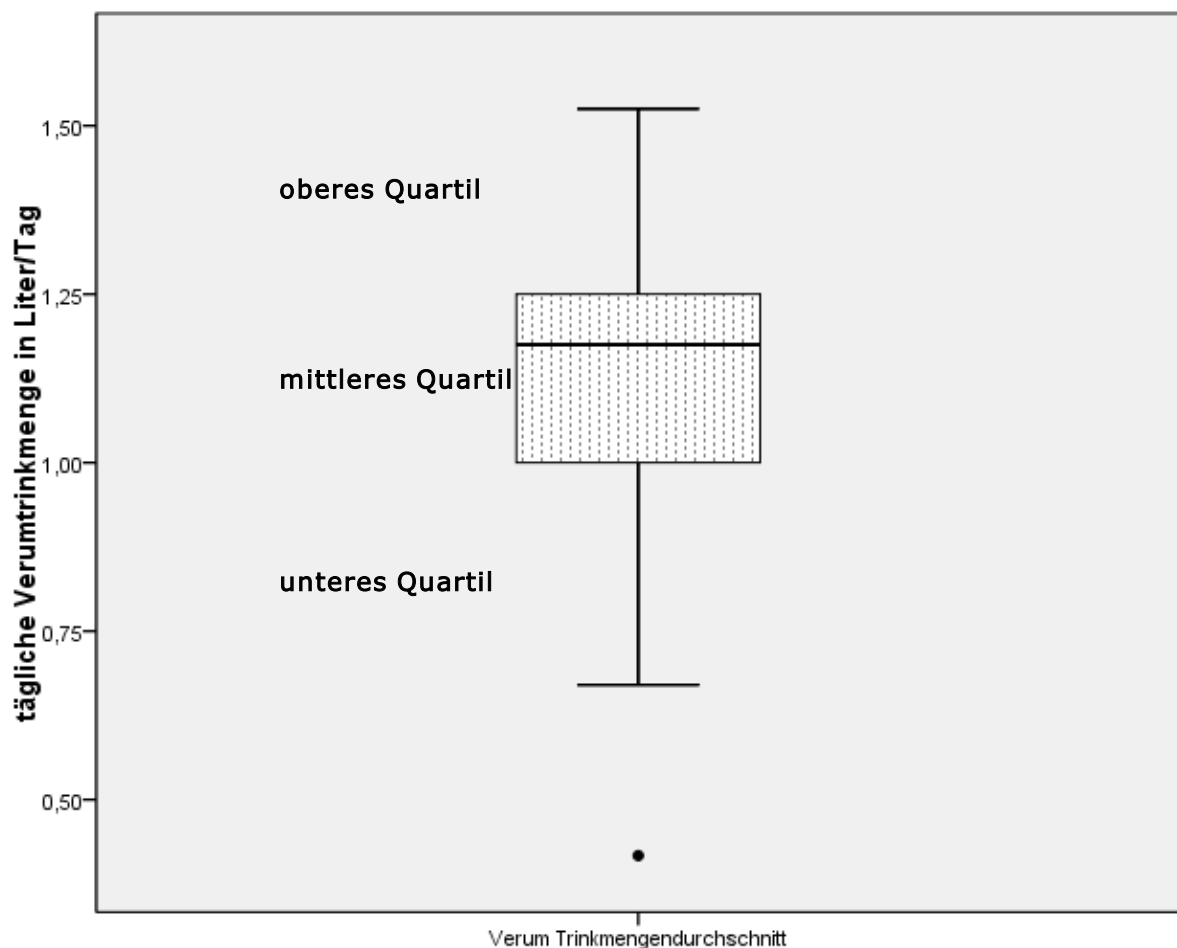


Abbildung 11: Quartilendarstellung der täglichen Verumtrinkmenge

<b>Trinkgruppe</b>	<b>Probandenzahl</b>	<b>durchschnittliche Trinkmenge pro Tag</b>	<b>durchschnittliche Flavonidaufnahme pro Tag</b>
Wenigtrinker	10	< 1,0 Liter	< 4,15 mg
Mitteltrinker	22	1,0 Liter bis 1,25 Liter	4,15 mg bis 5,20 mg
Vieltrinker	10	> 1,25 Liter	> 5,20 mg

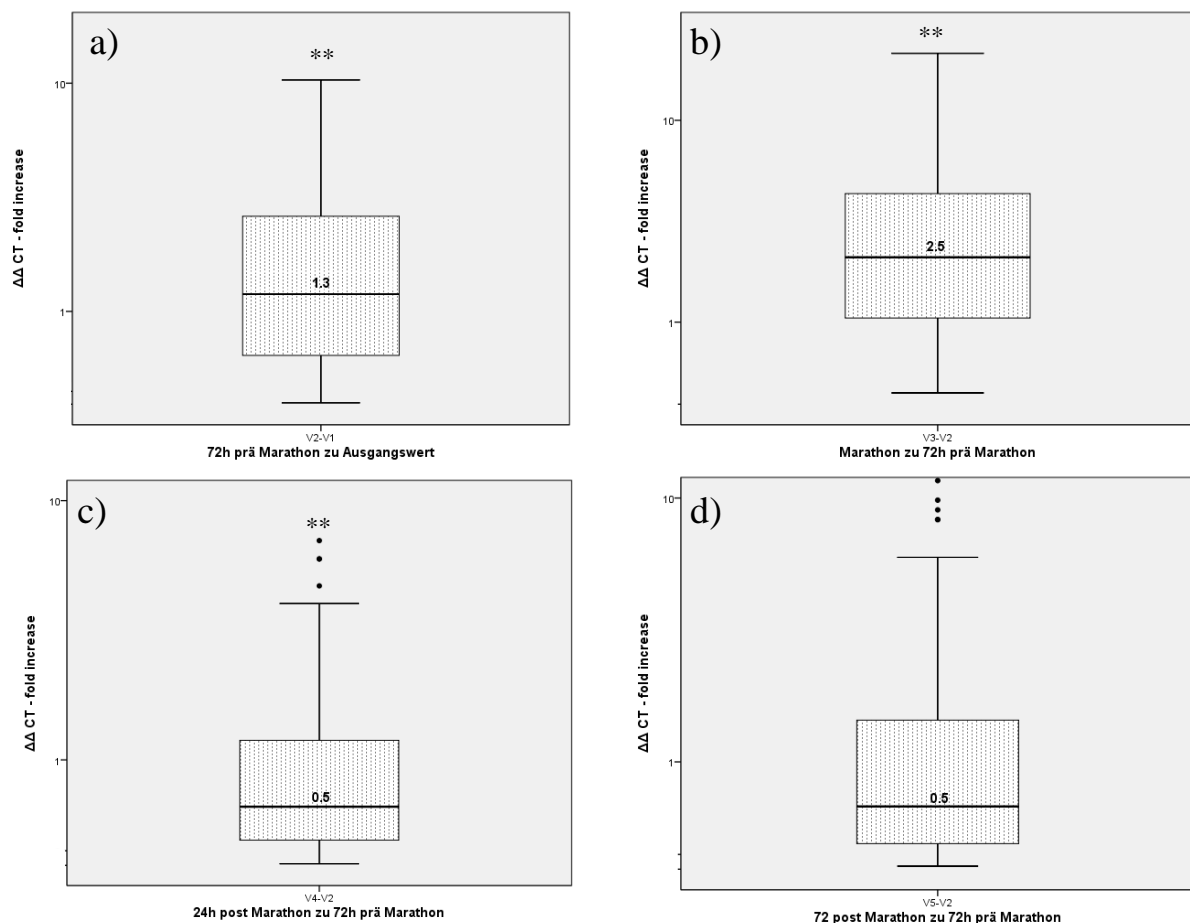
**Tabelle 4: Probandenzahlen nach Aufteilung in Wenig-, Mittel- und Vieltrinkergruppen**

Bei den einzelnen Visiten ergaben sich in Bezug auf die tägliche Trinkmenge der Probanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der BDCA 1 und BDCA 2 Werten in den einzelnen Trinkgruppen. Des Weiteren zeigte sich auch zwischen den jeweiligen Verumtrinkgruppen und der Gruppe der Placebotrinker bei keiner Visite ein signifikanter Unterschied in den BDCA 1 und BDCA 2 Konzentrationen.

## 3.2 TLR Genexpression

### 3.2.1 Veränderung der TLR 2 Genexpression im Studienverlauf

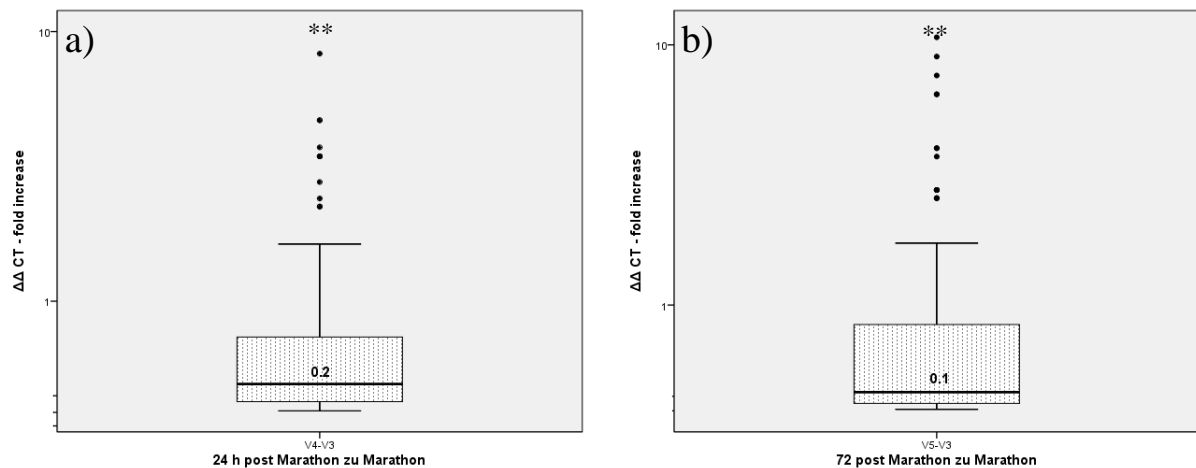
Im Vergleich der Werte der TLR 2 Genexpression zu den Daten nach der Trainings- und Aufwärmphase mit dem Studiengetränk ergab sich bei einer Probandenzahl von 105 folgendes Bild: Im Verlauf der dreiwöchigen Vorbereitungsphase war die Genexpression von Visite 1 zu Visite 2 (nach Abschluss der Trainingsphase 72 Stunden vor Marathon) hochsignifikant auf das 1.3-fache gestiegen (siehe Abbildung 12 a). Von Visite 2 zu Visite 3 (Marthontag) kam es zu einem weiteren, hochsignifikanten, 2.5-fachen Anstieg der Genexpression (siehe Abbildung 12 b). 24 Stunden nach dem Marathon (Visite 4) waren die Werte hochsignifikant gegenüber Visite 2 auf die Hälfte des Ausgangsniveaus abgefallen (siehe Abbildung 12 c). Im Vergleich von Visite 2 zu Visite 5 (72 Stunden nach Marathon) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Genexpression (siehe Abbildung 12 d).



**Abbildung 12:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 2 Genexpression zu unterschiedlichen Studienzeitpunkten gegenüber Werten bei Studienbeginn bzw. 72 Stunden vor dem Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01



Im Vergleich zum Marathontag, Visite 3, zeigten sich sowohl 24 Stunden nach dem Marathon, Visite 4, als auch noch 72 Stunden später bei Visite 5 hochsignifikante Abfälle in der Genexpression des TLR 2 auf den 0.2-fachen 24 Stunden und den 0.1-fachen Wert 72 Stunden nach dem Marathon (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Vergleich der relativen Veränderung der TLR 2 Genexpression gegenüber dem Marathonwert a) Vergleich 24 Stunden nach Marathon zu Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01**

### 3.2.2 Veränderung der TLR 4 Genexpression im Studienverlauf

Für die Genexpression des TLR 4 ergab sich nach der dreiwöchigen Vorbereitungsphase ein hochsignifikanter Anstieg der Werte um das 1.4-fache (siehe Abbildung 14 a). Zwischen Visite 2 und Visite 3 (Marathontag) zeigte sich hingegen keine signifikante Veränderung der Genexpression (siehe Abbildung 14 b); sie sank bei Visite 4 (siehe Abbildung 14 c) auf das 0.03-fache und bei Visite 5 auf das 0.3-fache im Vergleich mit Visite 2 beide Male hochsignifikant ab.

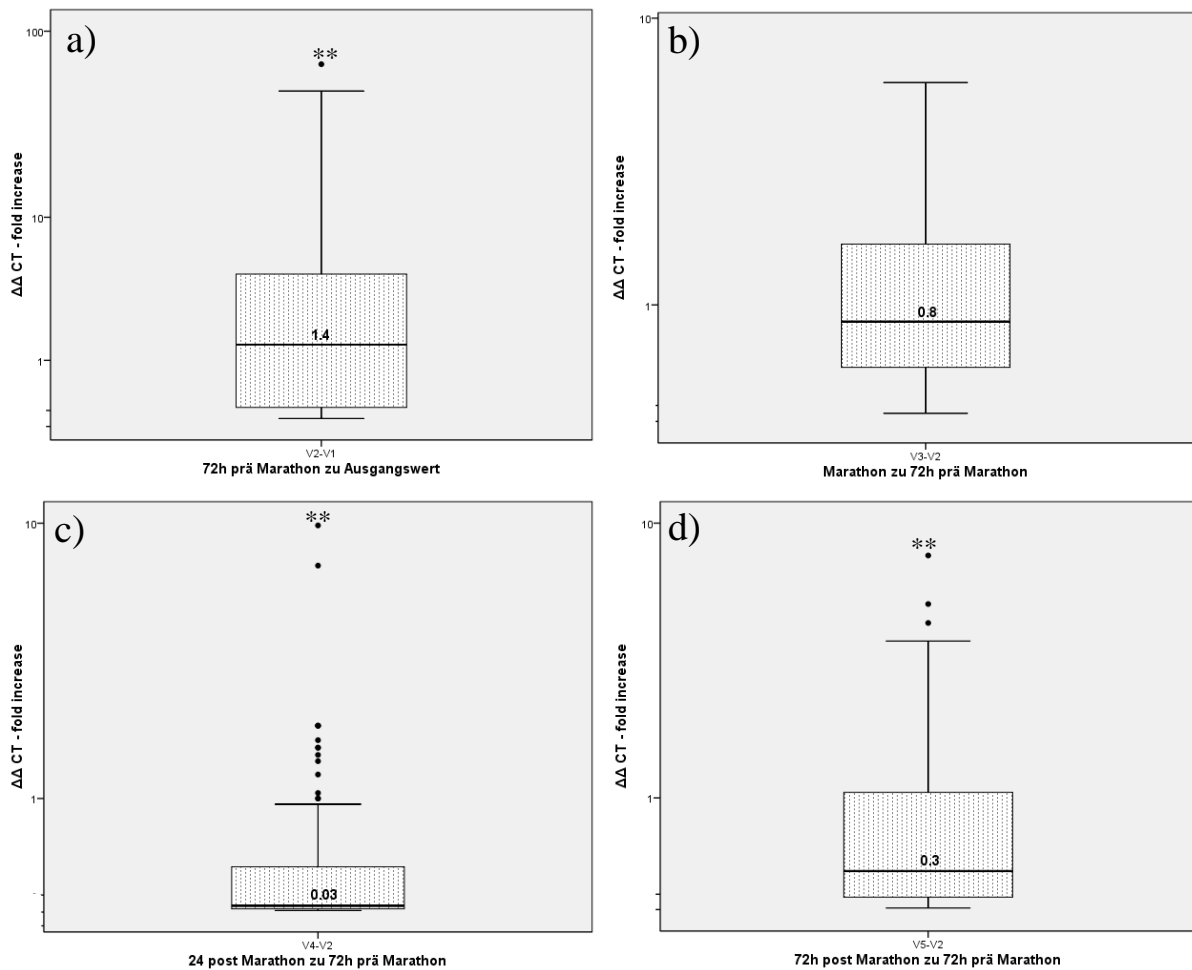
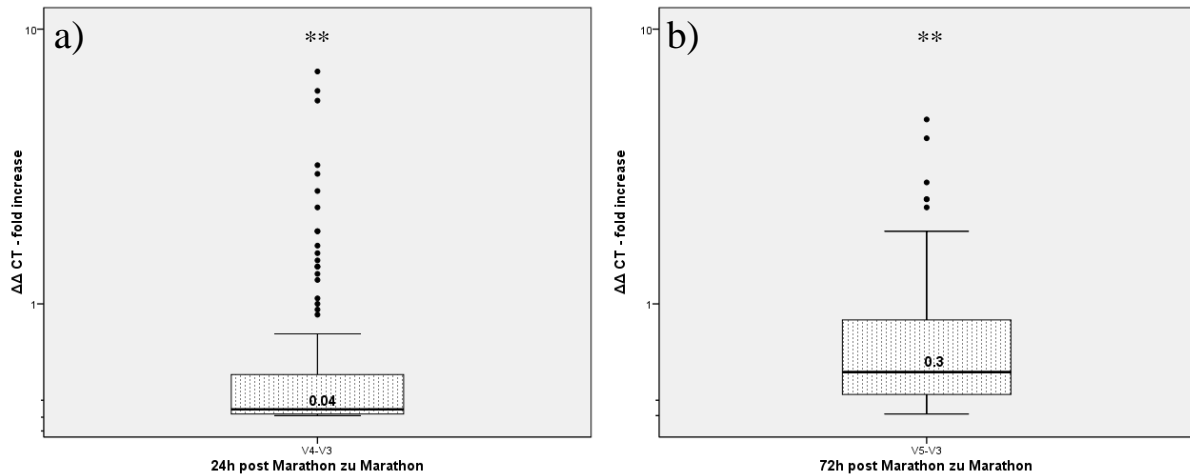


Abbildung 14: Vergleich der relativen Veränderung der TLR 4 Genexpression gegenüber dem Wert bei Studienbeginn bzw. 72 Stunden vor dem Marathon a) Vergleich Wert bei Studienbeginn vor Trainingsphase zu 72 Stunden vor Marathon (Trainingsphase) b) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon Wert c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01

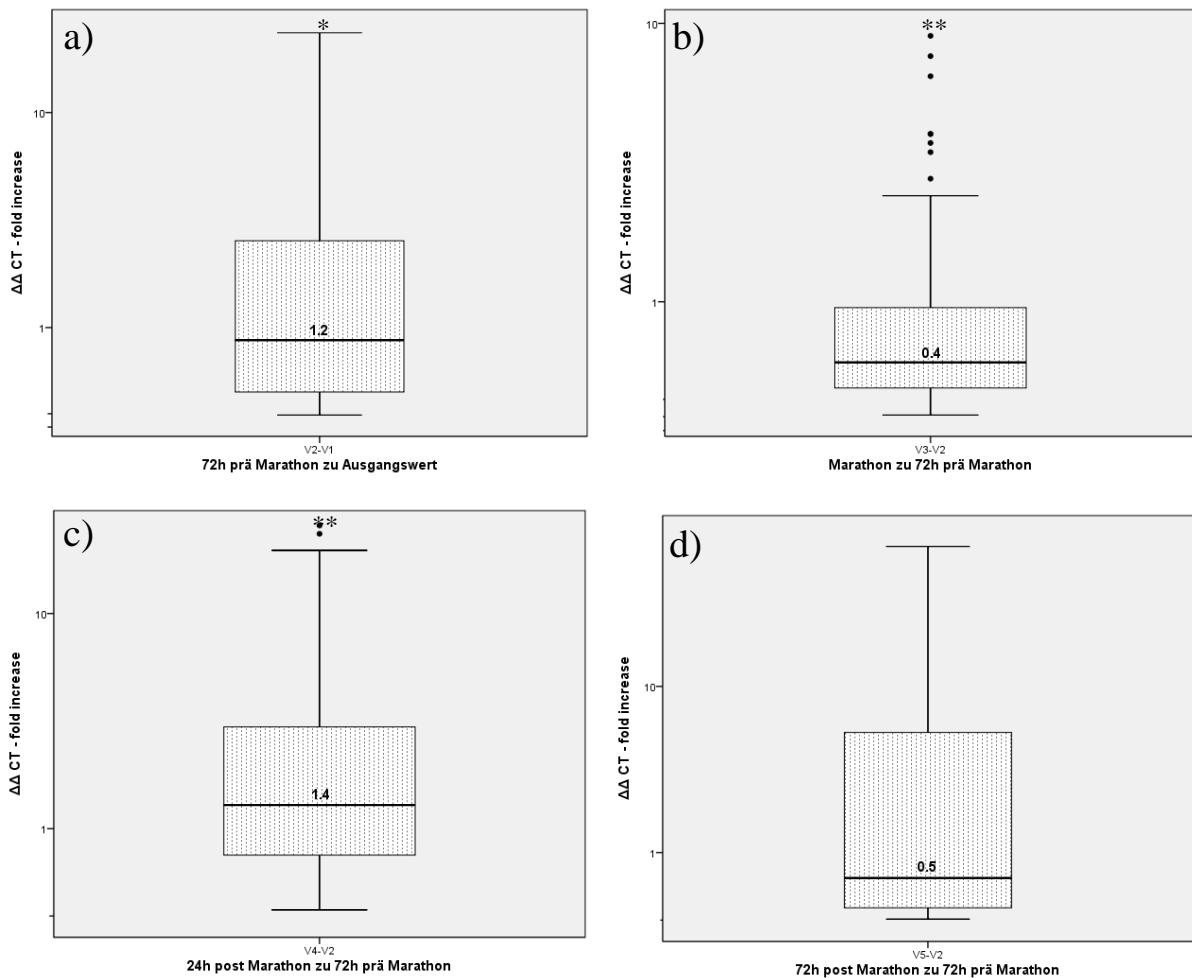
Gegenüber dem Marathon zeigte sich bei den Folgevisiten (24 und 72 Stunden nach dem Marathon) jeweils eine hochsignifikante Abnahme der Toll-like Rezeptor 4 Genexpression auf den 0.04-fachen Wert (24 Stunden, siehe Abbildung 15 a) und den 0.3-fachen Wert (72 Stunden, siehe Abbildung 15 b) nach dem Marathon.



**Abbildung 15: Vergleich der relativen Veränderung der TLR 4 Genexpression gegenüber dem Marathonwert a) Vergleich 24 Stunden nach Marathon zu Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01**

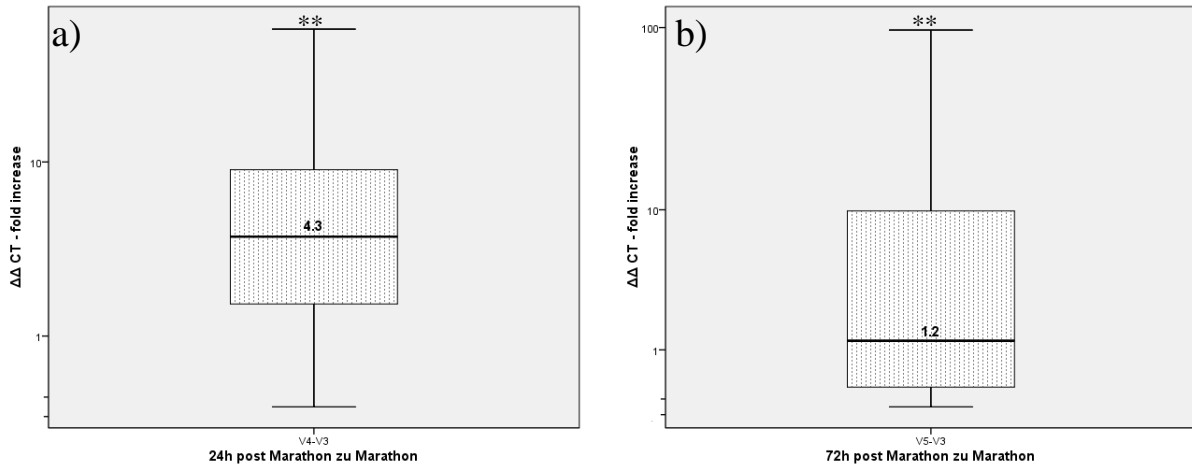
### 3.2.3 Veränderung der TLR 7 Genexpression im Studienverlauf

Bei der Genexpression des TLR 7 zeigte sich ein signifikanter Anstieg zwischen Visite 1 und 2 auf das 1.2-fache (siehe Abbildung 16 a). Nach dem Marathon (Visite 3) war die TLR 7 Genexpression gegenüber Visite 2 (72 Stunden vor dem Marathon) hochsignifikant auf das 0.4-fache abgefallen (siehe Abbildung 16 b). Bei Visite 4 (24 Stunden nach dem Marathon) wurde ein hochsignifikanter Anstieg der Werte auf das 1.4-fache im Vergleich zu Visite 2 dokumentiert (siehe Abbildung 16 c). Zwischen den Visiten 2 und 5 (72 Stunden nach dem Marathon) kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (siehe Abbildung 16 d).



**Abbildung 16: Vergleich der relativen Veränderung der TLR 7 Genexpression gegenüber dem Wert bei Studienbeginn bzw. 72 Stunden vor dem Marathon a) Vergleich Wert bei Studienbeginn zu 72 Stunden vor Marathon (Trainingsphase) b) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon; n = 105 / \* p < 0.05 / \*\* p < 0.01**

Im Vergleich zum Marathontag (Visite 3) zeigte sich 24 Stunden nach dem Marathon (Visite 4) ein hochsignifikanter Anstieg der Genexpression des TLR 7 auf das 4.3-fache des Ausgangswertes (siehe Abbildung 17 a). 72 Stunden nach dem Marathon (Visite 5) beobachtete man einen hochsignifikanten Anstieg in der Genexpression auf das 1.2-fache des Wertes (siehe Abbildung 17 b).

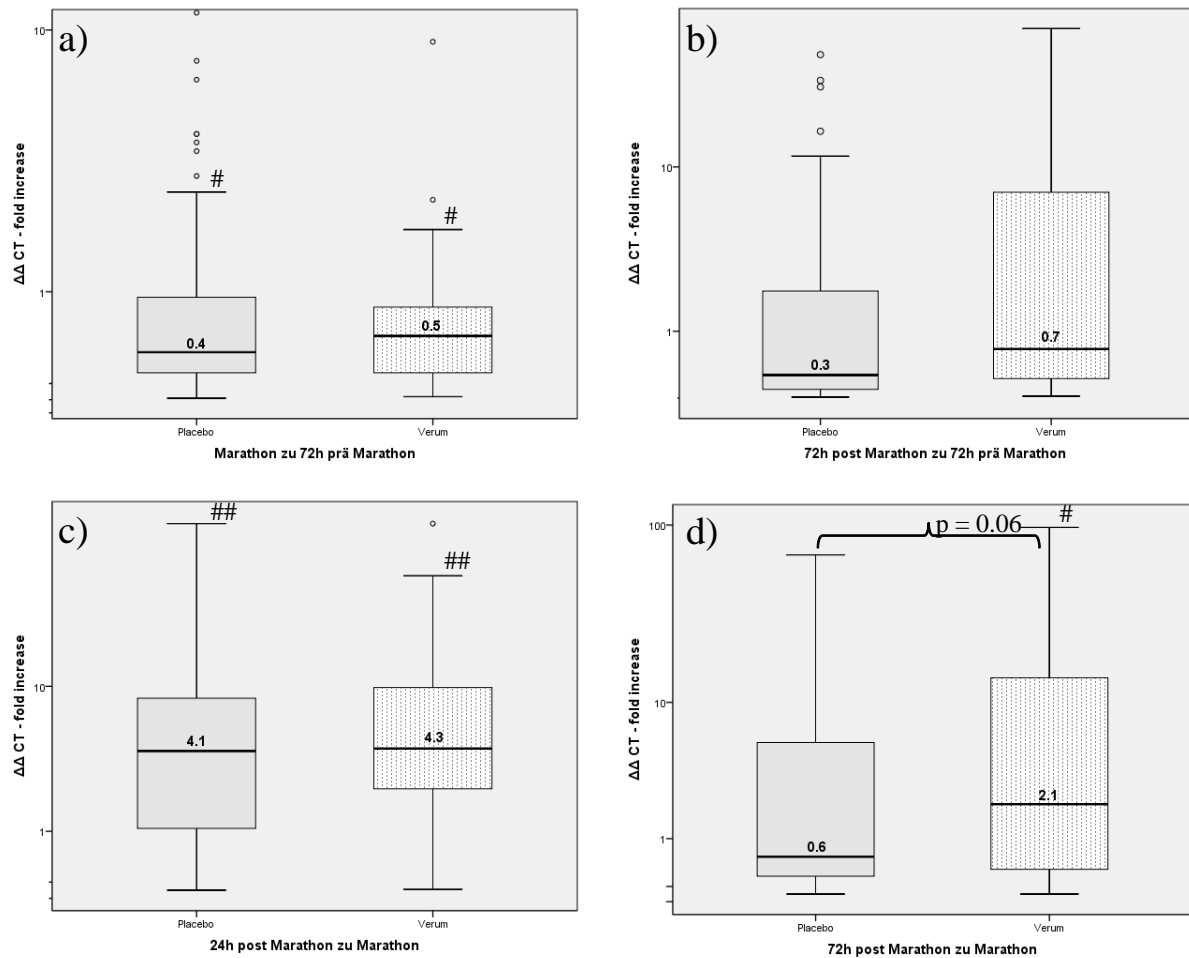


**Abbildung 17: Vergleich der relativen Veränderung der TLR 4 Genexpression gegenüber dem Marathonwert a) Vergleich 24 Stunden nach Marathon zu Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01**

### **3.2.4 Vergleich der Verumgruppe und ihrer Subgruppen mit der Placebogruppe hinsichtlich der Toll-like Rezeptor Genexpression**

Hinsichtlich der Genexpression der TLR 2, 4 und 7 zwischen der Verum- und der Placebogruppe ließen sich für keinen der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede feststellen.

Die Genexpression von TLR 7 der Placebo- und Verumgruppe zeigte folgende Ergebnisse: Im Vergleich zu 72 Stunden vor dem Marathon (Visite 2) kam es sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe am Marthontag (Visite 3) zu einem signifikanten Abfall der Genexpression auf das 0.4-fache (Placebo) beziehungsweise in der Verumgruppe auf das 0.5-fache (siehe Abbildung 18 a). Beim Vergleich der Werte 72 Stunden vor dem Marathon (Visite 2) zu 72 Stunden nach dem Marathon (Visite 5) zeigte sich sowohl in der Placebo-, wie auch der Verumgruppe keine signifikante Veränderung der Werte (siehe Abbildung 18 b). 24 Stunden nach dem Marathon (Visite 4) wiesen beide Gruppen einen hochsignifikanten Anstieg gegenüber dem Marthontag auf, die Placebogruppe auf das 4.1-fache, die Verumgruppe auf das 4.3-fache (siehe Abbildung 18 c). In der Placebogruppe waren die Werte 72 Stunden nach dem Marathon (Visite 5) gegenüber den Parametern direkt nach dem Marathonlauf (Visite 3) nicht signifikant verändert, während sie in der Verumgruppe signifikant um das 2.1-fache erhöht waren. Eine statistische Signifikanz zwischen der Placebo- und der Verumgruppe wird hier knapp ( $p = 0.06$ ) verpasst (siehe Abbildung 18 d).



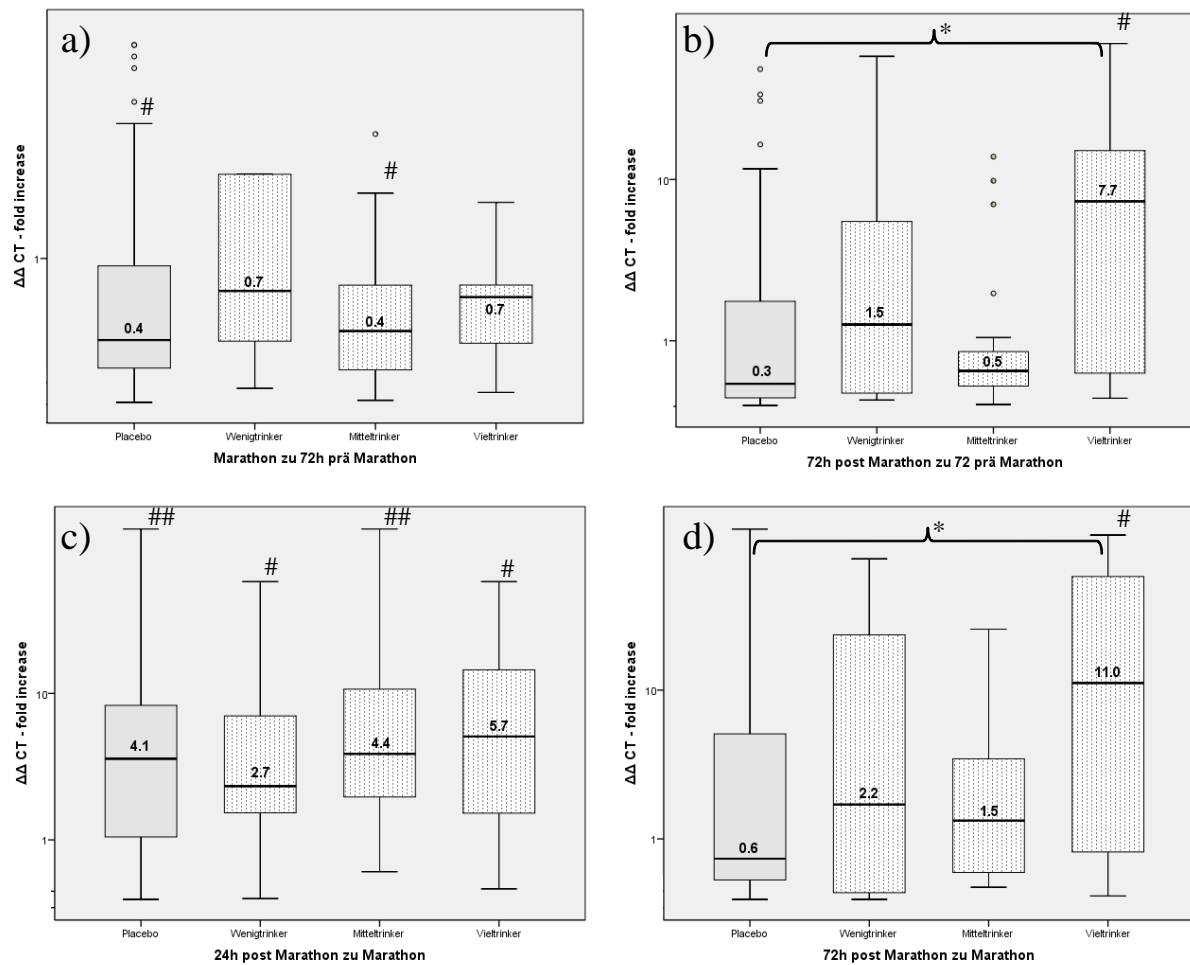
**Abbildung 18: Gegenüberstellung der Placebogruppe (grau) und Verumgruppe (hell) bezüglich Veränderung des TLR 7 a) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon: Signifikanz zwischen Placebogruppe und Verumgruppe wird knapp verpasst ( $p = 0.06$ ); Placebogruppe (grau,  $n = 58$ ) / Verumgruppe (hell,  $n = 47$ ); #  $p < 0.05$  / ##  $p < 0.01$**

Die Verumgruppe wurde, analog der dendritischen Subpopulationen, in eine Wenig- (< 1.00 Liter/Tag) mit 10, eine Mittel- (1.00 bis 1.25 Liter/Tag) mit 22 und eine Vieltrinkergruppe (> 1.25 Liter/Tag) mit 10 Probanden weiter aufgeteilt. In der Placebogruppe befanden sich 58 Probanden.

Bei Betrachtung der Subgruppen fielen für den Toll-like Rezeptor 7 im direkten Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon (Visite 5) zu 72 Stunden vor dem Marathon (Visite 2) und dem Marathon selbst (Visite 3) signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Vieltrinker und der Placebogruppe auf.

Beim Vergleich Visite 3 zu Visite 2 zeigte sich in allen Trinkgruppen eine Verringerung der Genexpression, die in der Placebo- und Mitteltrinkergruppe signifikant ausfiel (siehe Abbildung 19 a). 24 Stunden nach dem Marathon (Visite 4) waren die Werte in allen Trinkgruppen gegenüber Visite 3 signifikant (Wenig- und Vieltrinker) beziehungsweise hochsignifikant (Placebo- und Mitteltrinker) erhöht (siehe Abbildung 19 c). Bei dem Vergleich von Visite 5 zu Visite 2 zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen der Placebogruppe und der Gruppe der Vieltrinker. Während die Genexpression bei den Placebotrinkern auf das 0.3-fache im Vergleich zu Visite 2 abgenommen hatte, nahm sie bei den Vieltrinkern signifikant auf das 7.7-fache zu (siehe Abbildung 19 b). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei dem Vergleich der Visite 5 mit Visite 3; auch hier fielen die Werte in der Placebogruppe auf das 0.6-fache gegenüber dem Visite 3 ab, während sie in der Vieltrinkergruppe signifikant auf das 11-fache anstiegen, auch hier ist der Unterschied beider Trinkgruppen signifikant (siehe Abbildung 19 d).





**Abbildung 19:** Darstellung der Unterschiede in der TLR 7 Genexpression nach Untergliederung in die Trinkgruppen a) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; Placebogruppe (n = 58) / Wenigtrinker (n = 10) / Mitteltrinker (n = 22) / Vieltrinker (n = 10); n = 105 / \* p < 0.05 / # p < 0.05 / ## p < 0.01

## **4 Diskussion**

### **4.1 Hintergrund**

Aus Studien ist bekannt, dass es eine Korrelation und einen dosisabhängigen Effekt zwischen körperlicher Belastung und dem Immunsystem gibt. Während längerfristiges moderates Ausdauertraining kardioprotektiv wirkt, die Häufigkeit von Infekten senkt und das Karzinomrisiko verringert, führen extreme körperliche Anstrengungen zu einer Belastung des Myokards und einer Suppression des Immunsystems mit konsekutiver Erhöhung der Inzidenz von Infekten [70, 72-75].

In einer früheren Studie konnten Nickel und Mitarbeiter nachweisen, dass moderates Ausdauertraining und extreme körperliche Belastung (Modell: Marathonlauf) einen Einfluss auf das Immunsystem haben, dargestellt durch eine Modifikation von BDCA 1 und BDCA 2 positiven DC sowie Toll-like Rezeptoren [54, 70].

Middleton sowie Nieman und Kollegen konnten belegen, dass neben physischen Ausdauerbelastungen auch die Ernährung ein immunmodulatorischen Potential besitzt [18, 35]. So führt die langfristige orale Aufnahme von Obst und Gemüse unter anderem zu einer verringerten Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen [76]. Diese Effekte werden den in Obst und Gemüse enthaltenen Flavonoiden, die anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen, zugeschrieben [77].

## **4.2 Immunmodulatorischer Effekt von aeroben Ausdauertraining und Extremlast auf dendritische Zellen und Toll-like Rezeptoren**

### **4.2.1 Trainingsphase**

Im Rahmen der hier vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass die dreiwöchige Trainingsphase vor dem eigentlichen Marathon für beide Probandengruppen (Verum-Placebogruppe) ähnliche Auswirkungen hat. So fand sich weder in der Verumgruppe noch in der Placebogruppe eine Veränderung hinsichtlich der Anzahl der BDCA 1 positiven DC an den zirkulierenden Leukozyten. Im Gegensatz dazu kam es bei der Anzahl BDCA 2 positiver DC im peripheren Blut in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg. Wie bereits oben ausgeführt, spielen die BDCA 2 positiven DC in der antiviralen Immunabwehr eine Schlüsselrolle, sie haben daneben auch eine Bedeutung bei einigen Autoimmunerkrankungen wie etwa dem Lupus erythematoses.

Nickel et. al. konnten bei übergewichtigen Probanden zeigen, dass durch zehnwöchiges Ausdauertraining die Konzentrationen von BDCA 1 positiven DC anstiegen während die BDCA 2 positiven DC durch das Training abfielen. Allerdings hatten diese übergewichtigen Probanden im Vergleich mit normalgewichtigen Sportlern deutlich erniedrigte BDCA 1 positive und erhöhte BDCA 2 positive Ausgangswerte und näherten sich durch die Trainingsphase den Werten der normalgewichtigen Sportler an. Bei den normalgewichtigen Athleten, die unserem Probandenkollektiv am ehesten entsprechen, fanden sich in der hier vorgestellten Studie bezüglich BDCA 1 und BDCA 2 trendmäßig die von Nickel und Mitarbeitern beschriebenen Veränderungen, die aber aufgrund einer niedrigeren Fallzahl nicht signifikant waren [54].

Durch die Expression des TLR 7 erkennen BDCA 2 positive DC virale Antigene und sind somit in der Lage, während der frühen Phase der angeborenen Immunantwort umgehend auf virale Infekte, wie zum Beispiel Infekte der oberen Atemwege, zu reagieren [78]. Für ein moderates aerobes Ausdauertraining wurde dagegen beschrieben, dass die Rate an Infekten in den oberen Atemwegen abnahm [79]. Eine mögliche Erklärung konnte der von uns beobachtete Anstieg der BDCA 2 positiven DC durch die Trainingsphase sein.

Zusätzlich zur Analyse der DC Subpopulationen wurde auch die Wirkung der dreiwöchigen Vorbereitungsphase (vor dem Marathon) auf die Genexpression der Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 7 untersucht. Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss von körperlicher Belastung auf TLR untersuchten. So beschrieben etwa Stewart und Flynn et al. eine durch

körperliches Training induzierte Abnahme der TLR 4 Expression in CD 14 positiven Zellen [80-81]. In unserer Studie zeigte sich nach dreiwöchiger Vorbereitungsphase in beiden Studiengruppen ein hochsignifikanter Anstieg für den TLR 2, der in die Erkennung gram-positiver Bakterien involviert ist, und auch für den TLR 4, der analog gram-negative Bakterien erkennt. Diese Diskrepanz zu den Erkenntnissen von Stewart und Flynn et al. könnte darin begründet sein, dass wir alle Leukozyten (PBMCs) in unsere Untersuchung mit einbezogen, während sich die oben erwähnte Arbeitsgruppe auf CD 14 positive Zellen beschränkte. Kritisch anzumerken ist, dass die Anstiege in der Genexpression von TLR2 und 4 um das 1.3-beziehungsweise 1.4-fache des Ausgangswertes trotz statistischer Signifikanz wohl keinen relevanten Einfluss auf die Abwehrfähigkeit des Organismus haben dürften, da sie in der Ausprägung zu gering ausgefallen sind. Im Gegensatz zu den TLR 2 und 4 konnten wir beim TLR 7 keine nennenswerte Veränderung der Expression nach der dreiwöchigen Trainingsphase, im Vergleich zu den Ausgangswerten zu Studienbeginn, dokumentieren.

#### **4.2.2 Marathon**

Direkt nach dem Marathon fand sich eine hochsignifikante Zunahme der BDCA 1 positiven DC an der gesamten Leukozytenpopulation im peripheren Blut, während die Anzahl der BDCA 2 positiven DC unter dem Einfluss von Marathon hochsignifikant abnahm.

Der Anstieg der BDCA 1 positiven DC direkt nach dem Marathon kann das Resultat einer Zellmobilisation aus unterschiedlichen Geweben oder des Monozytenpools im Blut sein. Zudem ist denkbar, dass durch eine Differenzierung von Monozytensubgruppen, die bei inflammatorischen Prozessen die Fähigkeit besitzen, sich in dendritische Zellen zu differenzieren, diese ansteigen [70]. Eine Erhöhung des Anteils BDCA 1 positiver DC scheint mit erhöhten antibakteriellen und antitumorösen Aktivitäten vergesellschaftet zu sein [82]. Man kann darüber spekulieren, ob der durch den Marathon hervorgerufene Anstieg von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  zum einen die Generierung von DC hervorruft, oder zum anderen eine Ausschüttung der monozyten-derived DC in das Blut induziert, zudem wären auch beide beschriebenen Effekte möglich [70].

Wichtig ist auch die Betrachtung des Verhältnisses von BDCA 1 positiven und BDCA 2 positiven DC. So konnten Smit et al. im Tierversuch mit dem RS-Virus zeigen, dass eine Erhöhung beider Subtypen zu einer verringerten Entzündungsaktivität führt. Eine Zunahme von BDCA 1 positiven DC und eine Abnahme von BDCA 2 positiven DC, wie in der

vorliegenden Studie beschrieben, könnte hingegen eine erhöhte Entzündungsaktivität mit vermehrter Infekthäufigkeit der oberen Atemwege zur Folge haben [83-84].

Suchanek et. al. konnten bei professionellen Eishockeyspielern einen signifikanten Anstieg sowohl der BDCA 1 als auch der BDCA 2 positiven DC nach einer 60 minütigen Trainingseinheit nachweisen [85]. Der Gegensatz zu unseren Ergebnissen (Abfall der BDCA 2 positiven DC) könnte durch die unterschiedliche Art und Dauer der körperlichen Belastung erklärbar sein (Eishockeytrainingseinheit: kurze Belastungszeiten, abgelöst durch Erholungszeiten; Marathon: konstante lange Belastung (der Schnellste der Probanden erreichte nach circa 150 Minuten das Ziel)). Konkordant mit dem Abfall der BDCA 2 positiven pDC zeigte sich auch eine signifikante Abnahme der der TLR 7 Genexpression direkt nach dem Marathon (TLR7 wird vorwiegend in BDCA 2 positiven pDC exprimiert).

Frühere Studien konnten aufzeigen, dass ein mit Marathonlauf assoziierter Stress Entzündungsreaktionen sowie eine erhöhte Ausschüttung von Katecholaminen und Kortikosteroiden hervorruft. Die erhöhten Kortikosteroidwerte, die der Entzündungsreaktion entgegenwirken, führen zu einer Unterdrückung des Immunsystems, welches wiederum die Ergebnisse für die in mehreren Studien belegte erhöhte Inzidenz von viralen Infekten nach extremen Ausdauerbelastungen erklärt [86-88].

Wie oben bereits erwähnt, sind wiederholte virale Infekte, die auch im Rahmen des open-window Effektes nach schwerer körperlicher Belastung durch RS Viren und Influenza Viren vermehrt auftreten, mit einer erhöhten Rate an Herzinfarkten vergesellschaftet [40-41]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Teilnahme an mehreren Marathonläufen pro Jahr eine dreifache Erhöhung des atherosklerotischen Risikos bewirkt [31]. Im Gegensatz zu Extrembelastung oder Sportabstinenz verringert moderates Ausdauertraining das Risiko für bakterielle und virale Infekte [89-90]. Aufgrund der Datenlage kann spekuliert werden, dass schwere körperliche Belastung zu einer Progression der Arteriosklerose führt.

Die essentielle Bedeutung von DC sowie TLR 7 bei viralen Infekten und deren Abwehr konnte in Tiermodellen gezeigt werden. So führte ein Mangel an BDCA 2 positiven DC zu einer verringerten viralen Clearance und einer gehäuften Infektion der Atemwege bei Mäusen [83]. Zudem zeigten TLR 7 defiziente Mäuse eine abgeschwächte Antwort gegenüber Influenzaviren, da die Erkennung der viralen single-strand RNA durch TLR 7 gehemmt und eine Produktion der anti-viral wirkenden Typ I IFN nicht mehr ausreichend möglich ist [68].

Die Gründe für die Verringerung der TLR 7 mRNA nach dem Marathon sind wahrscheinlich multifaktoriell. Neben der Abnahme der Anzahl pDC im peripheren Blut können auch die im Rahmen eines Marathonlaufes erhöhten anti-inflammatorischen IL-10 und IL-1ra Spiegel die TLR 7 Genexpression weiter erniedrigen. Parallel zur Abnahme der BDCA 2 positiven DC direkt nach dem Marathon und deren Erholung 24 Stunden danach zeigte sich auch bei der TLR 7 Genexpression ein gleichsinniges Verhalten [34, 70].

Die in unserer Studie gefundenen Resultate mit Abnahme der Anzahl pDC sowie Verringerung der Genexpression von TLR 7 im Anschluss an eine schwere körperliche Belastung könnten somit den in der Literatur beschriebenen open-window Effekt (erhöhte Infektanfälligkeit nach körperlicher Belastung, insbesondere der oberen Atemwege) erklären.

### **4.3 Immunmodulatorischer Effekt von Flavonoiden**

Für Flavonoide konnten in epidemiologischen Studien starke anti-oxidative und anti-inflammatorische Wirkungen nachgewiesen werden [91]. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte eine polyphenolreichen Ernährung ein vielversprechender Ansatz zur Reduktion der Aktivität chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der Atherosklerose sein [92-93]. So ließ sich ein indirekter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Flavonoideinnahme und einer Reduktion des Herzinfarkttrisikos herstellen [94-95]. Nickel et. al. konnten in vivo zeigen, dass Quercetin, ein Flavonoid, nicht nur die oxLDL Spiegel im Serum senkt, sondern auch den systemischen ADMA-Spiegel, der als eigenständiger Risikofaktor für Atherosklerose gilt, senken kann [14].

Die meisten Studien mit gereinigten Flavonoiden ergaben bisher enttäuschende Ergebnisse, wohingegen, wie in der hier vorliegenden Arbeit, durch die Verwendung von einer Mischung unterschiedlicher Flavonoide eindrucksvolle anti-inflammatorische und anti-oxidative Effekte beschrieben werden konnten [15, 93, 96].

In früheren Studien wurde gezeigt, dass schwere körperliche Belastung die Expression von TLR verringert, wohingegen Flavonoide auf die TLR Expression und somit auf die durch TLR induzierten Signalwege einen positiven Einfluss haben [93, 96-97]. Im Gegensatz dazu konnten wir keinen Einfluss von flavonoidreichem entalkoholisierten Weißbier auf die Modifikation der TLR Expression (nach Marathon) aufzeigen im Vergleich zur Placebogruppe.

Bezüglich der TLR 7 Genexpression 72 Stunden nach dem Marathonlauf zeigte sich hingegen ein Unterschied zur Placebogruppe. Im Gegensatz zur Placebogruppe kam es in der Verumgruppe zu einer Erhöhung der TLR 7 Genexpression, wobei der Anstieg in der Subgruppe mit der höchsten Flavonidaufnahme signifikant war. Nieman et al. konnten belegen, dass Ausdauersportler, die in einer dreiwöchigen Trainingsphase täglich 1 Gramm des Flavonoids Quercetin zu sich genommen hatten, nach einer extremen körperlichen Belastung eine geringere Infektanfälligkeit der oberen Atemwege aufwiesen als die Probanden, die in der Trainingsphase ein Placebo erhielten [15].

Wie bereits oben beschrieben, führte eine unterschiedliche körperliche Belastung zu einer unterschiedlichen TLR 7 Genexpression (Vorbereitungsphase: keine Veränderung zum Basiswert; Marathon: Abnahme der Genexpression, Erholungszeit post Marathon: Anstieg).

Die Einnahme von Flavonoiden zeigte hingegen, dass es in der Erholungszeit post Marathon zu einem höheren Anstieg der TLR 7 Genexpression kam im Vergleich zur Placebogruppe.

Scherr et. al. konnten mit Hilfe eines Gesundheitsfragebogens zeigen, dass Probanden, die das flavonoidreiche Studiengetränk zu sich genommen hatten, signifikant weniger Infekte der oberen Atemwege nach dem Marathon aufwiesen als Probanden die das Placebogetränk zu sich genommen hatten. Dies lässt vermuten, dass die Einnahme von Flavonoiden im Rahmen physisch verursachten Stresses einen positiven Einfluss auf die Infektanfälligkeit, insbesondere des oberen Respirationstraktes, hat [93].



#### **4.4 Limitationen der Studie**

Das menschliche Immunsystem ist ein hochkomplexes Gebilde, in welchem die Ernährung nur ein Aspekt unter einer Vielzahl von Faktoren ist. Die Effekte der Flavonoide als Bestandteil der Nahrung sind sicher multifaktoriell. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich zwei Aspekte einer Einflussnahme auf das Immunsystem, TLR 7 und DC, beschrieben.

Die Aufsättigungsphase mit dem flavonoidreichen Studiengetränk ist mit einer Dauer von drei Wochen relativ kurz bemessen. Die in Studien beobachteten Einflüsse auf den menschlichen Organismus sind häufig auf eine jahrelange flavonoidreiche Ernährung zurückzuführen [77, 98-99].

Nur ein kleiner Teil der Probanden erreichte die ursprünglich geforderte Trinkmenge von täglich 1,5 Liter des Studiengetränkes. Zudem erfolgte keine Konzentrationsbestimmung der intestinal aufgenommenen Flavonoide.

Die Ergebnisse der Studie mit ausgewählten Probanden (männlich, zwischen 18 und 60 Jahren, keine schwerwiegende Vorerkrankungen, geforderter absolvierter Halbmarathon) sind nicht ohne Weiteres auf die Gesamtbevölkerung übertragbar.

## 5 Zusammenfassung

Die Arbeit hatte zum Ziel, eine mögliche Beeinflussbarkeit einer extremen körperlichen Belastung auf das Immunsystem zu untersuchen. Zudem stellte sich die Frage, ob Flavonoide hierbei eine modulatorische Eigenschaft besitzen. Als Abbild des Immunsystems wurden zum einen Dendritische Zellen und zum anderen Toll-like Rezeptoren untersucht. Als Modell für eine extreme körperliche Belastung wählten wir den Marathon.

Die Probanden wurden in 2 Gruppen randomisiert. Während die Kontrollgruppe über die Dauer von 3 Wochen ein Getränk ohne Flavonoide zu sich nahm, tranken die Probanden der Interventionsgruppe mit Flavonoiden angereichertes alkoholfreies Weißbier. Zwei gewählte Vertreter des Immunsystems, Dendritische Zellen und Toll-like Rezeptoren, wurden sowohl in der Trainingsphase, direkt nach dem Marathon, als auch in der Erholungsphase bei 105 männlichen Sportlern bestimmt. Die im Blut zirkulierenden Dendritischen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie als BDCA 1 positive (myeloide) und BDCA 2 positive (plasmazytoide) dendritische Zellen quantifiziert. Die Bestimmung der Genexpression der Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 7 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes erfolgte mittels rtPCR.

In der dreiwöchigen Vorbereitungsphase zeigte sich in beiden Studienpopulationen ein gegenläufiges Verhalten von BDCA 1 positiven Dendritischen Zellen, die unverändert blieben und BDCA 2 positiven Dendritischen Zellen, die hingegen signifikant anstiegen. Da BDCA 2 positive Zellen in der Lage sind, virale Antigene während der frühen Phase der angeborenen Immunantwort zu erkennen und umgehend auf virale Infekte zu reagieren, kann postuliert werden, dass moderates aerobes Ausdauertraining zu einer verringerten Rate an Infekten in den oberen Atemwegen führen kann. Im Gegensatz zu den Veränderungen der BDCA 1 und 2 positiven DC konnte während der Vorbereitungsphase kein relevanter Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Toll-like Rezeptoren dokumentiert werden. Zudem zeigte kein Einfluss der Flavonoidaufnahme auf die Veränderungen der Dendritischen Zellen oder TLR Genexpression.

Der Marathon selbst führte dagegen zu einem signifikanten Abfall sowohl der BDCA 2 positiven Dendritischen Zellen als auch der Toll-like Rezeptor 7 Genexpression. Die Ergebnisse könnten somit einen Aspekt des sogenannten open-window Effekts erklären (erhöhte Inzidenz von Infekten der oberen Atemwege als Hinweis auf eine eingeschränkte Immunantwort nach extremer körperlicher Ausdauerbelastung).

In der Erholungsphase (72 Stunden nach dem Marathon) zeigte die Untergruppe mit der höchsten Flavonidaufnahme im Vergleich zu den anderen Gruppen einen signifikanten Wiederanstieg der Toll-like Rezeptor 7 Genexpression auf. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass eine ausreichende Flavonoidkonzentration zu einer bei den Probanden seltener beobachteten Infektion der oberen Atemwege führt. Flavonoide scheinen somit einen positiven Einfluss auf die Immunmodulation im Rahmen physisch verursachten Stresses zu haben, der sich beispielhaft mittels Veränderungen der Toll-like Rezeptor 7 Genexpression abbilden lässt.

Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass das menschliche Immunsystem ein hochkomplexes System darstellt. Somit ist es schwierig, Einflussgrößen wie z.B. extreme körperliche Belastung oder Flavonoide adäquat abbilden zu können. In der vorliegenden Arbeit konnten wir einen Teilaspekt dieses hochkomplexen Systems analysieren, indem der Einfluss von extremer physischer Belastung durch einen Marathon auf das Immunsystem am Beispiel von Dendritischen Zellen und Toll-like Rezeptoren sowie eine Modifikation durch Flavonoide aufgezeigt wurde.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalievirus
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
DC	Dendritic Cell/ Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FSC	Forward scatter
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High-Density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MyD 88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid Anion
OH•	Hydroxylradikal
(ox)LDL	(oxidiertes) Low-Density Lipoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Monocytes
PBS	Phosphate Buffered Saline
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rtPCR	real time Polymerase Chain Reaction
SSC	Side scatter
TBS-T	Tris Buffered Saline – Tween
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

## 7 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Chemische Strukturformeln von Quercetin, Catechin und Genistein

**Abbildung 2:** Darstellung von DC im Elektronenmikroskop (Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik)

**Abbildung 3:** Die Rolle von DC in atherosklerösen Plaques

**Abbildung 4:** Hauptliganden der TLR

**Abbildung 5:** Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie

**Abbildung 6:** Vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie

**Abbildung 7:** Anteil BDCA 1 positiver mDC an den im Blut zirkulierenden Leukozyten; n = 105 / \* p < 0.05 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 8:** Vergleich von Verumgruppe zu Placebogruppe bezüglich BDCA 1 positiver mDC; Verumgruppe (weiß, n = 47) / Placebogruppe (schraffiert, n = 58); \* p < 0.05 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 9:** Relativer Anteil BDCA 2 positiver pDC an den im Blut zirkulierenden Leukozyten; n = 105 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 10:** Vergleich Verumgruppe zu Placebogruppen bezüglich BDCA 2 positiver pDC; Verumgruppe (weiß, n = 47) / Placebogruppe (schraffiert, n = 58); \* p < 0.05 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 11:** Quartilendarstellung der täglichen Verumtrinkmenge

**Abbildung 12:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 2 Genexpression zu unterschiedlichen Studienzeitpunkten gegenüber Werten bei Studienbeginn bzw. 72 Stunden vor dem Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 13:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 2 Genexpression gegenüber dem Marathonwert a) Vergleich 24 Stunden nach Marathon zu Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 14:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 4 Genexpression gegenüber dem Wert bei Studienbeginn bzw. 72 Stunden vor dem Marathon a) Vergleich Wert bei Studienbeginn vor Trainingsphase zu 72 Stunden vor Marathon (Trainingsphase) b) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon Wert c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 15:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 4 Genexpression gegenüber dem Marathonwert a) Vergleich 24 Stunden nach Marathon zu Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; n = 105 / \*\* p < 0.01

**Abbildung 16:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 7 Genexpression gegenüber dem Wert bei Studienbeginn bzw. 72 Stunden vor dem Marathon a) Vergleich Wert bei Studienbeginn zu 72 Stunden vor Marathon (Trainingsphaseb) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon; n = 105 / \*  $p < 0.05$  / \*\*  $p < 0.01$

**Abbildung 17:** Vergleich der relativen Veränderung der TLR 4 Genexpression gegenüber dem Marathonwert a) Vergleich 24 Stunden nach Marathon zu Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; n = 105 / \*\*  $p < 0.01$

**Abbildung 18:** Gegenüberstellung der Placebogruppe (grau) und Verumgruppe (hell) bezüglich Veränderung des TLR 7 a) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon: Signifikanz zwischen Placebogruppe und Verumgruppe wird knapp verpasst ( $p = 0.06$ ); Placebogruppe (grau, n = 58) / Verumgruppe (hell, n = 47); #  $p < 0.05$  / ##  $p < 0.01$

**Abbildung 19:** Darstellung der Unterschiede in der TLR 7 Genexpression nach Untergliederung in die Trinkgruppen a) Vergleich Marathon zu Wert 72 Stunden vor dem Marathon b) Vergleich 72 Stunden nach dem Marathon zu 72 Stunden vor dem Marathon c) Vergleich 24 Stunden nach dem Marathon zu Marathon d) Vergleich 72 Stunden nach Marathon zu Marathon; Placebogruppe (n = 58) / Wenigtrinker (n = 10) / Mitteltrinker (n = 22) / Vieltrinker (n = 10); n = 105 / \*  $p < 0.05$  / #  $p < 0.05$  / ##  $p < 0.01$

## **8 Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des Studiengetränkes

**Tabelle 2:** Polyphenolanalyse des Studiengetränkes

**Tabelle 3:** rtPCR, verwendete Primer für GAPDH, TLR 2, 4 und 7

**Tabelle 4:** Probandenzahlen nach Aufteilung in Wenig-, Mittel- und Vieltrinkergruppen

## 9 Literaturverzeichnis

1. Gielen, S., et al., *Risk factor management: antiatherogenic therapies*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2009. **16 Suppl 2**: p. S29-36.
2. Fruchart, J.C., et al., *New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III15-9.
3. McGill, H.C., Jr., C.A. McMahan, and S.S. Gidding, *Preventing heart disease in the 21st century: implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) study*. Circulation, 2008. **117**(9): p. 1216-27.
4. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
5. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
6. Nickel, T., et al., *oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation*. Atherosclerosis, 2009. **205**(2): p. 442-50.
7. Singh, U. and I. Jialal, *Oxidative stress and atherosclerosis*. Pathophysiology, 2006. **13**(3): p. 129-42.
8. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
9. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(2): p. 131-8.
10. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20963-6.
11. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
12. Rimm, E.B., et al., *Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men*. N Engl J Med, 1993. **328**(20): p. 1450-6.
13. Manach, C., A. Mazur, and A. Scalbert, *Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases*. Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(1): p. 77-84.
14. Nickel, T., et al., *Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in vitro and in vivo*. Eur J Nutr, 2010.
15. Nieman, D.C., et al., *Quercetin reduces illness but not immune perturbations after intensive exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(9): p. 1561-9.
16. Arts, I.C., et al., *Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study*. Am J Clin Nutr, 2001. **74**(2): p. 227-32.
17. Nair, M.P., et al., *The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(3): p. 319-28.
18. Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 673-751.
19. Lippi, G., et al., *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(1): p. 59-70.
20. Frankel, E.N., et al., *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*. Lancet, 1993. **341**(8843): p. 454-7.



21. Romeo, J., et al., *Moderate alcohol consumption and the immune system: a review*. Br J Nutr, 2007. **98 Suppl 1**: p. S111-5.
22. Bingensis, H., *Heilkunde - Das Buch von dem Grund und Wesen und der Heilung der Krankheiten*. 1957, Salzburg: Otto Müller Verlag. p. 332.
23. Nickel, T., et al., *Modification of endothelial biology by acute and chronic stress hormones*. Microvasc Res, 2009. **78**(3): p. 364-9.
24. Wilbert-Lampen, U., et al., *Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on monocyte function, mediated by CRH-receptor subtype R1 and R2: a potential link between mood disorders and endothelial dysfunction?* J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(1): p. 110-6.
25. Zen, M., et al., *The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(6): p. 305-10.
26. <http://www.joggen-online.de/marathon/marathonveranstaltungen/muenchen-marathon.html>. 2011.
27. <http://www.runnersworld.de/laufevent/newyorkmarathon/2011>. 2011.
28. <http://www.runnersworld.de/laufevent/newyorkmarathon/2010>. 2011.
29. Thompson, P.D., et al., *Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity)*. Circulation, 2003. **107**(24): p. 3109-16.
30. Mora, S., et al., *Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms*. Circulation, 2007. **116**(19): p. 2110-8.
31. Mohlenkamp, S., et al., *Running: the risk of coronary events : Prevalence and prognostic relevance of coronary atherosclerosis in marathon runners*. Eur Heart J, 2008. **29**(15): p. 1903-10.
32. Ferreira, M., et al., *Sudden cardiac death athletes: a systematic review*. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol, 2010. **2**: p. 19.
33. Belonje, A., et al., *Major adverse cardiac events during endurance sports*. Am J Cardiol, 2007. **99**(6): p. 849-51.
34. Nieman, D.C., et al., *Cytokine changes after a marathon race*. J Appl Physiol, 2001. **91**(1): p. 109-14.
35. Nieman, D.C., *Immune response to heavy exertion*. J Appl Physiol, 1997. **82**(5): p. 1385-94.
36. Larrabee, R.C., *Leucocytosis after violent Exercise*. J Med Res, 1902. **7**(1): p. 76-82.
37. Woods, J.A., et al., *Effects of exercise on the macrophage MHC II response to inflammation*. Int J Sports Med, 1997. **18**(6): p. 483-8.
38. Kakanis, M.W., et al., *The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes*. Exerc Immunol Rev, 2010. **16**: p. 119-37.
39. Guan, X.R., et al., *Respiratory syncytial virus infection and risk of acute myocardial infarction*. Am J Med Sci, 2010. **340**(5): p. 356-9.
40. Thompson, W.W., et al., *Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States*. JAMA, 2003. **289**(2): p. 179-86.
41. Gurfinkel, E.P., et al., *Flu vaccination in acute coronary syndromes and planned percutaneous coronary interventions (FLUVACS) Study*. Eur Heart J, 2004. **25**(1): p. 25-31.
42. Morre, S.A., et al., *Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis*. J Clin Pathol, 2000. **53**(9): p. 647-54.
43. Muhlestein, J.B., *Bacterial infections and atherosclerosis*. J Investig Med, 1998. **46**(8): p. 396-402.

44. Seldenrijk, A., et al., *Psychological distress, cortisol stress response and subclinical coronary calcification*. Psychoneuroendocrinology, 2011.
45. Hamer, M., et al., *Salivary cortisol responses to mental stress are associated with coronary artery calcification in healthy men and women*. Eur Heart J, 2010. **31**(4): p. 424-9.
46. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
47. Granucci, F., I. Zanoni, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1683-97.
48. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
49. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
50. Ueno, H., et al., *Dendritic cell subsets in health and disease*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 118-42.
51. Patterson, S., et al., *Human BDCA-1-positive blood dendritic cells differentiate into phenotypically distinct immature and mature populations in the absence of exogenous maturational stimuli: differentiation failure in HIV infection*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 8200-9.
52. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
53. Blanco, P., et al., *Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 41-52.
54. Nickel, T., et al., *Immunomodulatory effects of aerobic training in obesity*. Mediators Inflamm, 2011. **2011**: p. 308965.
55. Yilmaz, A., et al., *Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(1): p. 70-80.
56. Fransen, J.H., et al., *The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(2): p. 207.
57. Naderi, G.A., et al., *Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation*. Mol Cell Biochem, 2003. **246**(1-2): p. 193-6.
58. Spence, L., et al., *Incidence, etiology, and symptomatology of upper respiratory illness in elite athletes*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(4): p. 577-86.
59. Stein, D., et al., *The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal*. Cell, 1991. **65**(5): p. 725-35.
60. Carpenter, S. and L.A. O'Neill, *How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses?* Cell Microbiol, 2007. **9**(8): p. 1891-901.
61. Akira, S., *Toll receptor families: structure and function*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 1-2.
62. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. **13**(1): p. 11-6.
63. Hayakawa, Y., et al., *Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of Staphylococcus aureus in dairy cows*. Vet Microbiol, 2000. **72**(3-4): p. 321-7.
64. Echchannaoui, H., et al., *Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation*. J Infect Dis, 2002. **186**(6): p. 798-806.
65. Perera, P.Y., et al., *CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 574-81.

66. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
67. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
68. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
69. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
70. Nickel, T., et al., *Modulation of dendritic cells and toll-like receptors by marathon running*. Eur J Appl Physiol, 2011.
71. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
72. Trivax, J.E., et al., *Acute cardiac effects of marathon running*. J Appl Physiol, 2010. **108**(5): p. 1148-53.
73. Neilan, T.G., et al., *Myocardial injury and ventricular dysfunction related to training levels among nonelite participants in the Boston marathon*. Circulation, 2006. **114**(22): p. 2325-33.
74. Hoffman-Goetz, L. and B.K. Pedersen, *Exercise and the immune system: a model of the stress response?* Immunol Today, 1994. **15**(8): p. 382-7.
75. Bernecker, C., et al., *Evidence for an exercise induced increase of TNF-alpha and IL-6 in marathon runners*. Scand J Med Sci Sports, 2011.
76. Bazzano, L.A., et al., *Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(1): p. 93-9.
77. Hodgson, J.M., *Effects of tea and tea flavonoids on endothelial function and blood pressure: a brief review*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(9): p. 838-41.
78. Di Domizio, J., et al., *TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1794-802.
79. Matthews, C.E., et al., *Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(8): p. 1242-8.
80. Stewart, L.K., et al., *Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4*. Brain Behav Immun, 2005. **19**(5): p. 389-97.
81. Flynn, M.G., et al., *Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women*. J Appl Physiol, 2003. **95**(5): p. 1833-42.
82. Akazawa, T., et al., *Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors*. FEBS Lett, 2007. **581**(18): p. 3334-40.
83. Smit, J.J., B.D. Rudd, and N.W. Lukacs, *Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1153-9.
84. Smit, J.J., et al., *The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1720.
85. Suchanek, O., et al., *Intensive physical activity increases peripheral blood dendritic cells*. Cell Immunol, 2010. **266**(1): p. 40-5.
86. Nieman, D.C., *Marathon training and immune function*. Sports Med, 2007. **37**(4-5): p. 412-5.
87. Nieman, D.C., et al., *Effects of long-endurance running on immune system parameters and lymphocyte function in experienced marathoners*. Int J Sports Med, 1989. **10**(5): p. 317-23.

88. Peters, E.M. and E.D. Bateman, *Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. An epidemiological survey.* S Afr Med J, 1983. **64**(15): p. 582-4.
89. Nieman, D.C., L.M. Johanssen, and J.W. Lee, *Infectious episodes in runners before and after a roadrace.* J Sports Med Phys Fitness, 1989. **29**(3): p. 289-96.
90. Martin, S.A., B.D. Pence, and J.A. Woods, *Exercise and respiratory tract viral infections.* Exerc Sport Sci Rev, 2009. **37**(4): p. 157-64.
91. Holt, E.M., et al., *Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents.* J Am Diet Assoc, 2009. **109**(3): p. 414-21.
92. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.* N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
93. Scherr, J., et al., *Nonalcoholic beer reduces inflammation and incidence of respiratory tract illness.* Med Sci Sports Exerc, 2012. **44**(1): p. 18-26.
94. Hertog, M.G., et al., *Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study.* Arch Intern Med, 1995. **155**(4): p. 381-6.
95. Hertog, M.G., et al., *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.* Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1007-11.
96. Nieman, D.C., et al., *Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity.* Med Sci Sports Exerc, 2009. **41**(7): p. 1467-75.
97. Lee, J.K., et al., *Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by luteolin.* Biochem Pharmacol, 2009. **77**(8): p. 1391-400.
98. Hodgson, J.M. and K.D. Croft, *Tea flavonoids and cardiovascular health.* Mol Aspects Med, 2010. **31**(6): p. 495-502.
99. Peters, U., C. Poole, and L. Arab, *Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis.* Am J Epidemiol, 2001. **154**(6): p. 495-503.

## 10 Danksagung

Viele Personen haben mich im Laufe der Erstellung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei:

Frau PD Dr. Ute Wilbert-Lampen für die Möglichkeit in Ihrer Arbeitsgruppe dieses interessanten Dissertationsthemas bearbeiten zu können und den kompetenten Beistand.

Herrn Dr. Thomas Nickel für die engagierte Betreuung, stete Ermutigung und Diskussion der Arbeit.

Der Heinrich und Lotte Mühlfenzl-Stiftung für die finanzielle Unterstützung ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Johannes Scherr und seinem gesamten Team der Poliklinik für Präventive und Rehabilitative Sportmedizin des Klinikums rechts der Isar und der Fakultät für Sportwissenschaft der Technischen Universität München, ohne die es die BeMAGIC Studie nie gegeben hätte.

Allen Teilnehmern der BeMaGIC Studie für ihre Bereitschaft sich einem anstrengendem Training und Marathonlauf und diverser Erhebungen Studien-relevanter Parameter zu unterziehen.

Frau Zeljka Sisic und Herrn Marius Lambert, die mir nicht nur den Laboralltag näherbrachten, sondern mir auch bei allen Experimenten im Labor tatkräftig zur Seite standen.

Herrn Dr. Korbinian Lackermair, der gleichzeitig mit mir seine Dissertation in der Arbeitsgruppe anfertigte, und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Sowie den vielen freiwilligen Helfern, die, bei Wind und Wetter, für einen reibungslosen und einwandfreien Probentransport nach Großhadern sorgten, insbesondere bei Frau Christine Göß, Frau Christina Hartmann, Frau Jasmin Weihs, Frau Nora Rahm und Herrn Matthias Wiedemann.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit von Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 15.01.2013

.....

(Unterschrift)